

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**MARIA JÚLIA FERESIN OLIVOTTO
MAYARA BRINGEL DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DA
INTERLEUCINA-6 (-174 G>C) E SUA POSSÍVEL
CORRELAÇÃO COM O CÂNCER GÁSTRICO**

BAURU
2014

**MARIA JÚLIA FERESIN OLIVOTTO
MAYARA BRINGEL DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DA
INTERLEUCINA-6 (-174 G>C) E SUA POSSÍVEL
CORRELAÇÃO COM O CÂNCER GÁSTRICO**

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

BAURU
2014

Olivotto, Maria Julia Feresin.

O495c

Caracterização do Polimorfismo da Interleucina-6 (-174 G>C) e sua possível correlação com o Câncer gástrico / Maria Julia Feresin Olivotto; Mayara Bringel dos Santos. -- 2014.

37f. : 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. Interleucina 6. 3. Polimorfismo. 4. Câncer gástrico. 5. PCR. I. Santos, Mayara Bringel dos. II. Oliveira, Juliana Garcia de. III. Título.

**MARIA JÚLIA FERESIN OLIVOTTO
MAYARA BRINGEL DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DA INTERLEUCINA-6 (-174 G>C) E
SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO COM O CÂNCER GÁSTRICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde 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. Rita Luiza Peruquetti
Universidade Sagrado Coração

Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen
Universidade Sagrado Coração

Profª Drª Juliana Garcia de Oliveira
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 03 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTO

À Profa Dra. Juliana Garcia de Oliveira pela orientação, empenho e por me proporcionar oportunidade e base para desenvolver a pesquisa enriquecendo minha formação.

À minha parceira de trabalho Maria Júlia por toda ajuda e amizade.

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

Ao técnico do laboratório de Biologia Molecular Wilson Orcini pela disponibilidade, colaboração, paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen por todo apoio e colaboração durante toda a pesquisa.

Às meninas estagiárias do laboratório que compartilharam os aprendizados.

Ao FAP-USC (Fundo de Amparo à Pesquisa) e a FAPESP pelo apoio financeiro durante a realização da pesquisa.

À toda Equipe da EE Prof. Morais Pacheco pela amizade e por me ajudarem a tornar possível a realização deste projeto, em especial à Dona Sônia e Heloisa por toda compreensão, ajuda e incentivo.

À minha irmã Talita e cunhado Erli que mesmo longe me apoiaram, encorajaram e colaboraram de todas as formas sempre que precisei.

Aos meus pais Antonio Carlos e Margarete, por todo amor, pelos ensinamentos, apoio, pela dedicação, ajuda, por contribuírem com toda a minha educação sem nunca me deixarem desistir, onde com eles desabafei e comemorei cada conquista, me motivaram e me deram confiança. Muito obrigada.

Enfim, agradeço a Deus, pela oportunidade de encontrar pessoas tão especiais e pela dádiva de sonhar e realizar!

AGRADECIMENTO

À Profa Dra. Juliana Garcia de Oliveira pela orientação, empenho e por me proporcionar oportunidade e base para desenvolver a pesquisa enriquecendo minha formação.

À minha companheira Mayara pelo companheirismo e amizade.

À Universidade Sagrado Coração, pelo apoio e estrutura para a realização das pesquisas.

Ao Prof^o Dr. Lucas Trevizani Rasmussen pelo apoio e dedicação durante a pesquisa.

Ao PIBIC pelo apoio financeiro durante meu projeto de iniciação científica.

Ao meu namorado Lucas pela paciência e companheirismo de todas as horas, sempre me apoiando nas decisões e me ajudando a driblar os obstáculos.

Aos meus irmãos André Vinícius e Luiz Fernando por todo amor e confidencialidade, sempre me apoiando e me ajudando de alguma forma.

Aos meus sogros Vânia e Maurício por também acreditarem em mim e mesmo indiretamente terem contribuído para a minha formação.

À minha cunhada, irmã e amiga Louise pela confidencialidade e companheirismo de tantos anos.

A todos os professores que passaram por minha vida durante esses 4 anos de graduação, por terem transmitido um pouco de seus ensinamentos para contribuir com a minha formação.

Aos meus pais Antonio e Antonia, por todo amor, paciência, carinho, dedicação e principalmente pela educação e ensinamentos transmitidos a mim. Obrigada por acreditarem em mim, terem me apoiado nos momentos mais difíceis, e terem se alegrado com minhas vitórias. Agradeço pela existência de vocês em minha vida, a quem devo todo o meu respeito e admiração.

Agradeço a Deus por ter feito com que eu não desistisse em momento algum e, principalmente, por ter feito com que eu realizasse mais esse sonho. Obrigada pelas pessoas que colocastes em minha vida durante essa caminhada, as amigas conquistadas que vou carregar comigo o resto da vida.

"Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade." Albert Einstein

RESUMO

O *Helicobacter pylori* tem sido descrito na literatura como o responsável pela gênese de gastrite, úlcera péptica e neoplasias gástricas. Estudos comprovam que fatores genéticos do hospedeiro são determinantes para o risco da inflamação gástrica e para o desenvolvimento dos diversos tipos de cânceres, assim a resposta inflamatória aguda e crônica contra o *H. pylori* apresenta um papel fundamental no prognóstico do paciente. Esta resposta é regulada diferencialmente pela secreção de diferentes interleucinas envolvidas na cascata inflamatória, sendo que a Interleucina 6 (IL-6) tem um papel importante na carcinogênese gástrica. O polimorfismo genético da *IL-6* pode ser o fator chave do hospedeiro que aumenta a predisposição para o desenvolvimento de câncer gástrico. O presente estudo teve como objetivo genotipar pela técnica de PCR-RFLP o polimorfismo da *IL-6* (-174 G>C) (rs 1800795) em 40 pacientes com Câncer Gástrico, 40 pacientes com gastrite crônica (positivos para o *H. pylori*) e 40 pacientes com a mucosa gástrica normal (negativos para o *H.pylori*). As frequências genotípicas para GG, GC e CC foram de 72,5, 20 e 7,5%, respectivamente, no grupo de câncer gástrico, 45, 45 e 10%, respectivamente, no grupo de gastrite crônica e 50, 40 e 10%, respectivamente, no grupo controle. Enquanto as frequências alélicas de G e C foram de 0,82 e 0,18, respectivamente, para o grupo de câncer gástrico; 0,68 e 0,32, respectivamente, para o grupo de gastrite crônica e 0,70 e 0,30, respectivamente, para o grupo Controle. Nas análises estatísticas foi observada uma associação dos genótipos GC e CC com uma menor susceptibilidade ao risco de câncer quando comparado os grupos Câncer e Controle (OR= 0,27, 95% IC=0,09-0,76, p=0,0091) e Câncer e Gastrite (OR=0,31, 95%IC=0,12-0,79, p=0,012), demonstrando o efeito protetor destes genótipos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Gastrite e Controle. Assim, evidenciou-se a associação protetora dos genótipos G/C e C/C ao risco de câncer gástrico entre a população avaliada, entretanto o número amostral precisa ainda ser ampliado para uma conclusão definitiva de nossos resultados.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, Interleucina 6. Polimorfismo. Câncer gástrico. PCR.

ABSTRACT

Helicobacter pylori has been described as responsible for the genesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Studies show that genetic factors in the host are determinant for the risk of gastric inflammation and cancer development. The acute and chronic inflammatory responses against *H. pylori* play a fundamental role in the patient prognosis. This response is regulated differentially by the secretion of various interleukins involved in the inflammatory cascade, and Interleukin 6 (IL-6) plays an important part in gastric cancer. The genetic polymorphism of *IL-6* may be a key factor that increases the host's predisposition to the gastric carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate the association of the *IL-6* (-174 G> C - rs 1800795) on the risk of lesions gastric using the PCR-RFLP technique in 120 individuals, being 40 patients with Gastric Cancer, 40 patients with Chronic Gastritis (positive for *H. pylori*), and 40 patients with normal histological gastric (negative for *H. pylori*). The genotype frequencies for GG, GC, and CC were 72.5, 20 and 7.5%, respectively, in the Gastric Cancer group; 45, 45 and 10, respectively, in the Chronic Gastritis group and 50, 40 and 10%, respectively, in the Control group. The allele frequencies of G and C were 0.82 and 0.18, respectively, for the gastric cancer group; 0.68 and 0.32, respectively, for the chronic gastritis group and 0.70 and 0.30, respectively, for the control group. In the statistical analysis, an association of genotypes GC and CC with a reduced susceptibility to cancer risk was observed when comparing the Cancer and Control groups (OR = 0.27, 95 % CI = 0.09 to 0.76, p = 0.0091) and Cancer and Chronic Gastritis (OR = 0.31, 95 % CI = 0.12 to 0.79, p = 0.012), demonstrating the protective effect of these genotypes. There was no statistically significant difference between Gastritis and Control groups. Thus, the study revealed a protective association of *IL-6* -174 GC and CC genotypes and the risk of gastric cancer among the study population, however, further investigations could provide a better understanding of the role of this genetic variant on the etiology of *H. pylori* infection and gastric carcinogenesis.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Interleukin 6, polymorphism, gastric cancer, PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO	11
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.2 OBJETIVOS	15
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	15
2.3.2 CASUÍSTICA	15
2.3.3 ESTUDO MOLECULAR	16
2.3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	18
2.4 RESULTADOS	19
3 DISCUSSÃO	24
4 CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	26
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO	32
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	34

1. INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), foi descrito na literatura primeiramente por Marshall & Warren em 1983, trata-se de uma bactéria gram-negativa, espiralada, contendo de 6 a 8 flagelos arranjados em forma unipolar ou bipolar, que coloniza o estômago humano e pode provocar uma inflamação crônica, podendo progredir para gastrite atrófica, metaplasia, displasia e finalmente o câncer gástrico (Figura 1). Esta bactéria é um fator de risco conhecido para o desenvolvimento de doenças gastroduodenais devido a grandes alterações na morfologia celular e indução à liberação de moléculas, incluindo citocinas, a partir do epitélio gástrico (TAKEUCHI et al., 2012).

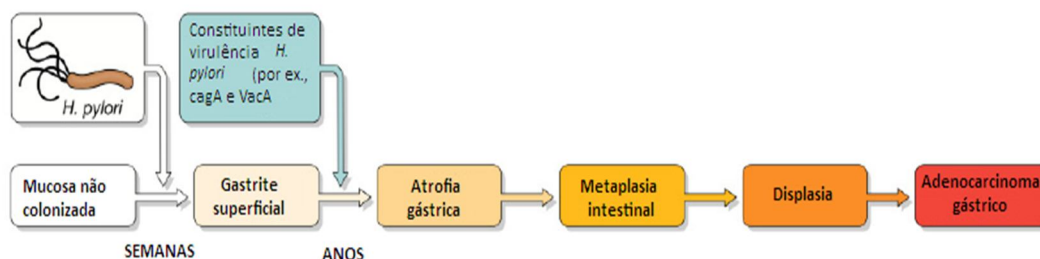


Figura 1. Progressão do adenocarcinoma gástrico intestinal. Colonização do *H. pylori* normalmente ocorre na infância e leva à gastrite superficial. A presença de fatores de risco como genes de virulência bacteriana aumentam o risco de progressão para atrofia gástrica e finalmente o adenocarcinoma gástrico. (Modificado de PEEK; FISKE; WILSON, 2010).

De fato, desde a sua descoberta no início de 1980, o *H. pylori* tem sido reconhecido como o agente causador de dois tipos de câncer, o adenocarcinoma gástrico e linfoma da mucosa associada ao tecido linfóide (MALT). A associação direta entre a infecção com este patógeno e o desenvolvimento de câncer gástrico levou a classificação de *H. pylori* como carcinógeno classe I, que é atualmente a única bactéria assim classificada (RAFIEI et al., 2012).

Durante a fase inicial da infecção, o *H. pylori* adere às células epiteliais do antro gástrico, estimulando a liberação de quimiocinas e citocinas, estes mediadores pró-

inflamatórios induzem a infiltração de neutrófilos e linfócitos, levando ao desenvolvimento de uma inflamação. Apesar desta resposta imunológica, a infecção pode permanecer por décadas (KIM et al., 2012).

O tratamento de *H. pylori* reduz acentuadamente o risco de recorrência da úlcera duodenal e melhora as alterações inflamatórias gástricas. A melhoria histológica da inflamação gástrica ocorre imediatamente após a erradicação do *H. pylori*, no entanto, a resposta inflamatória aguda (com neutrófilos) difere quanto a resolução da resposta inflamatória crônica (com células mononucleares): neutrófilos desaparecem em algumas semanas, enquanto que a regressão de células mononucleares ocorre gradualmente (MORGAN et al., 1988). Uma vez instalada, a colonização do *H. pylori* é capaz de induzir a síntese de várias citocinas como Interleucina-6 e Interleucina-8 que regulam a quimiotaxia, a ativação neutrofílica e de células mononucleares (ANDO et al., 1998)

A prevalência da infecção é diferente em todo o mundo, de acordo com o nível socioeconômico e as condições de saneamento (KAZEMI et al., 2011). Em países desenvolvidos varia entre 17 a 59% visto que as taxas são muito altas em países em desenvolvimento. No Brasil a prevalência de *H. pylori* pode alcançar 80% em adultos (TSENG et al., 2006; YAMAOKA 2008).

Os sintomas das doenças gástricas causadas pela *H. pylori* aparecem mais frequentemente em adultos, embora a aquisição desta bactéria tenha ocorrido na infância (quase sempre antes da idade de 10 anos) e na ausência de antibioticoterapia adequada geralmente persiste por toda a vida, sendo este o principal fator etiológico da gastrite e ulcera péptica (CHIESA et al., 2010; PACIFICO et al., 2010).

Investigações para a patogênese do *H. pylori* têm sido realizadas, aumentando as expectativas de remédios curativos para maior parte das doenças gástricas, entretanto os avanços têm sido tão lentos que ainda hoje temos a detecção precoce e ressecção curativa do câncer gástrico como melhor prevenção (LEE, 2014).

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. REVISÃO DE LITERATURA

GASTRITE CRÔNICA E ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

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 2). 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 (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

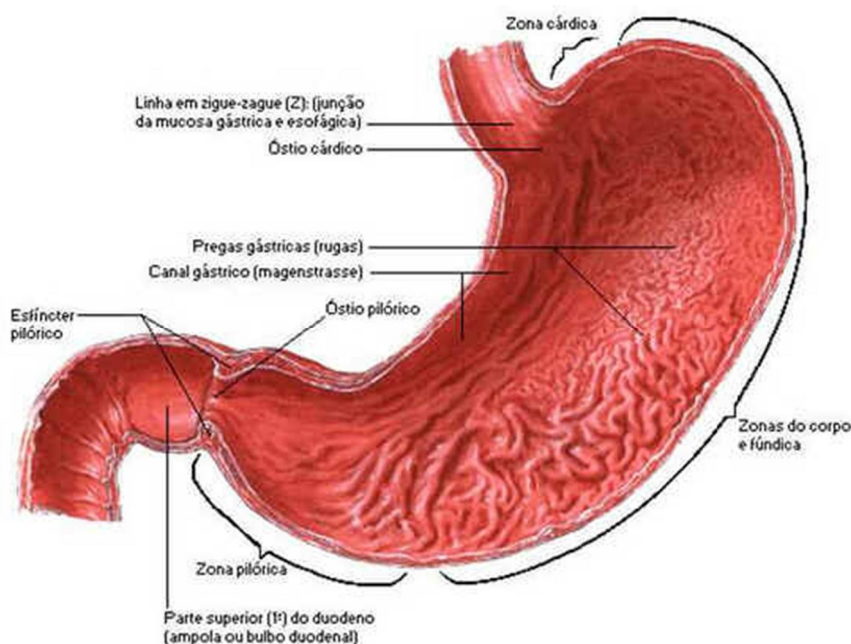


Figura 2. Representação das regiões anatômicas e histológicas do estômago. Fonte: Portal São Francisco. Disponível em: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-sistema-digest.php>.

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, ela 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; et al., 2009).

Pesquisas genéticas têm demonstrado o papel dos componentes chaves da inflamação na carcinogênese. Os fatores determinantes desses diferentes resultados incluem a intensidade e a distribuição da inflamação pelo *H. pylori* na mucosa gástrica. (EL-OMAR, 2006). Na gastrite crônica, as lesões vão desde o processo inflamatório superficial até a atrofia do epitélio. Aproximadamente 10% dos pacientes com atrofia gástrica desenvolvem adenocarcinoma em um período de 15 anos (CHELI; GIACOSA, 1983).

Também denominado câncer gástrico, os tumores do estômago se apresentam, predominantemente, na forma de três tipos histológicos: adenocarcinoma (responsável por 95% dos tumores), linfoma, diagnosticado em cerca de 3% dos casos, e leiomiossarcoma, iniciado em tecidos que dão origem aos músculos e aos ossos (INCA, 2014).

No Brasil, o câncer gástrico aparece em quarto lugar na incidência entre homens e em sexto, entre as mulheres. A estimativa para novos casos em 2014 é de 20.390, sendo 12.870 homens e 7.520 mulheres. Sendo que o pico de incidência ocorre entre homens com cerca de 70 anos de idade (INCA, 2014)

O adenocarcinoma representa aproximadamente 95% dos casos de neoplasias malignas gástricas, sendo classificado com base em aspectos histopatológicos e clínicos em dois tipos: intestinal e difuso (LAUREN, 1965). As lesões do tipo intestinal são as mais frequentes, bem diferenciadas, localizadas na região do corpo e antro gástrico, dependentes de fatores ambientais e associadas com a presença de lesões pré-cancerosas. São encontradas predominantemente em homens e indivíduos idosos. O tipo difuso é pouco diferenciado e encontrado principalmente na região da cárdia, tem prognóstico ruim e não está associado a lesões pré-cancerosas. É um pouco mais frequente em mulheres e pacientes jovens e tem alta ocorrência familiar, principalmente entre indivíduos com tipo sanguíneo A (TAHARA et al. 2004; FOX; WANG, 2007; INCA, 2014).

INTERLEUCINAS

As Interleucinas são moléculas de peptídeos que mediam a interação entre as células do sistema imune com outros sistemas, entre eles o sistema endócrino. As mesmas são produzidas por uma variedade de células e seus efeitos biológicos se dão através da ligação em receptores específicos (EL-OMAR, 2001). As citocinas incluem as interleucinas e interferons (NAOUM, 2009).

Entre as citocinas produzidas na mucosa gástrica de pessoas infectadas por *H. pylori*, a IL-8 é conhecida por ser especificamente envolvida no recrutamento e ativação de neutrófilos. Enquanto, a IL-6 tem amplos efeitos biológicos em células mononucleares, incluindo a diferenciação de linfócitos e a ativação de macrófagos (ANDO et al., 1998).

INTERLEUCINA 6

A IL-6 é uma citocina multifatorial produzida por células imunes e não imunes incluindo, monócitos, linfócitos, macrófagos, células endoteliais e células do epitélio intestinal, sendo que o principal estímulo para sua secreção é a IL-1 com a qual compartilha muitas ações em comum. O gene que codifica a IL-6 encontra-se localizado no cromossomo 7p21 e funciona como um mediador inflamatório, regulador endócrino e com funções metabólicas (LAUTA, 2001).

Estudos “*in vivo*” e “*in vitro*” têm demonstrado que a infecção pelo *H. pylori* pode induzir o aumento da expressão de citocinas pelas células epiteliais, como as IL-6 e IL-8 quando comparadas com pacientes não infectados pela bactéria (YAMAOKA et al., 1996) e níveis elevados de IL-6 são relacionados com a presença de câncer gástrico quando comparado com lesões benignas (YAMAOKA et al., 1997).

É importante destacar que a IL-6 também desempenha um papel inflamatório conflitante em células tumorais. Pode promover a morte de células cancerígenas por estimulação da atividade antitumoral dos macrófagos e prevenir a apoptose dos neutrófilos; como pode ser produzida pelas células tumorais, ativando uma proteína denominada Rho,

que está associada à adesão célula-célula e à invasão do câncer (LUKASZEWICZ-ZAJĄC et al. 2011).

Alguns autores (MATSUO et al. 2003; LEE et al. 2010), têm demonstrado a expressão desta citocina e do seu receptor em câncer gástrico. Estes resultados sugerem que a IL-6 pode atuar como um fator de crescimento autócrino ou parácrino de carcinomas gástricos e desempenham um papel crucial na patogênese de câncer gástrico (LUKASZEWICZ-ZAJĄC et al. 2011).

Há dados que sugerem que a IL-6 tem um papel importante na carcinogênese gástrica em pacientes infectados pelo *Helicobacter pylori* e o polimorfismo genético da *IL-6* pode ser o fator chave do hospedeiro para o aumento da predisposição para o desenvolvimento de câncer gástrico (HANSSON et al., 1996).

Estudos que examinaram a expressão da IL-6 em tecidos de câncer gástrico em humanos e demonstrou que a expressão desta citocina foi positivamente correlacionada com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como a vascularização e grau histológico do tumor de estômago (LEE et al. 2010). Outro trabalho analisou o soro de pacientes com câncer gástrico, demonstrando que a quantidade de IL-6 em níveis mais altos foi um preditor de mau prognóstico. (KINOSHITA et al., 2013).

A alteração de uma única base na região 5' da região promotora do gene *IL-6* (bases -174) tem sido identificada. A presença do alelo G (guanina) na posição -174 tem sido associada com uma produção de elevados níveis de IL-6 comparados com a presença do alelo C em homozigose (TERRY et al., 2000). Estes níveis aumentados foram detectados secundariamente a infecção pelo *H. pylori* e são relacionados com a presença de câncer gástrico quando comparado com lesões benignas (CRABTREE; et al., 1994; YAMAOKA; et al., 1997;).

É importante ressaltar que além da infecção pelo *H. pylori* e a predisposição genética do hospedeiro, outros fatores também podem contribuir para a transformação neoplásica, os quais não dependem continuamente da presença da infecção pela bactéria (EL-OMAR et al., 2003), entre estes a dieta e o hábito de fumar podem também contribuir para o processo

de carcinogênese (MAYNE et al., 2003).

2.2 OBJETIVOS

Considerando amostras de biopsias gástricas coletadas de adultos com neoplasia gástrica; gastrite crônica; e adultos sem neoplasia, o presente projeto, teve como objetivos:

- Genotipar o polimorfismo da IL-6 (-174 G>C) (rs 1800795) em pacientes com adenocarcinoma gástrico, gastrite crônica e em pacientes sadios (livre de alterações histológicas).
- Correlacionar às frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo do gene da IL-6 (-174 G>C) (rs1800795) com as alterações endoscópicas e histopatológicas.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da Universidade Sagrado do Coração de Bauru-SP (USC), foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Sagrado Coração segundo parecer 541.172 (Anexo A). Todas as amostras foram referidas por código, resguardando a identificação dos indivíduos e de acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisas em Seres Humanos - Resolução CNS 196/96. Fazem 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 (Anexo B).

2.3.2 CASUÍSTICA

Neste estudo, caracterizado como um estudo do tipo caso-controle foram selecionadas 120 amostras de DNA de indivíduos adultos, sendo: 40 pacientes com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal de acordo com a classificação de Lauren (LAUREN, 1965), 40 pacientes com gastrite crônica classificadas pelo sistema de Sidney (DIXON, GENTA; YARDLEY, 1994), e 40 pacientes com a mucosa gástrica normal cujo

histopatológico foi negativo para qualquer lesão. Todas as amostras são 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.

Tabela 1. Descrição dos indivíduos dos grupos caso e controle, segundo as variáveis: sexo e presença ou ausência da bactéria *H. pylori*.

Variáveis	Câncer gástrico N (%)	Gastrite crônica N(%)	Controle N (%)
Sexo			
Feminino	17 (42,5%)	18 (45%)	26 (65%)
Masculino	23 (57,5%)	22 (55%)	14 (35%)
Total	40	40	40
<i>H. pylori</i>			
Positivos	33 (82,5%)	40 (100%)	0 (0%)
Negativos	7 (17,5%)	0 (0%)	40 (100%)
Total	40	40	40

Fonte: Elaborado pela autora.

2.3.3 ESTUDO MOLECULAR

GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DA IL-6:

A genotipagem do polimorfismo da IL-6 foi realizada pela Técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Primeiramente foi feita a amplificação de um fragmento de 300pb através da técnica da PCR, referente à região promotora do gene da *IL-6* (-174 G>C) (rs1800795) e utilizou-se para isso o par de *primers*: *sense* 5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTG^{-3'} e o *antisense* 5'-TCAGACATCTCCAGTCCTATA^{-3'}.

Na reação de PCR, volume final de 50 μL , foram utilizados 29 μL H_2O , 5,0 μL de PCR Buffer, 5,0 μL dNTPs (1,23 $\mu\text{mol/L}$), 2,0 μL de MgCl_2 (25 mmol/L), 2,5 μL de Formamida, 4,0 μL de *primers* (25 $\mu\text{mol/L}$), 2,0 μL de DNA genômico e 0,5 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 5 minutos para que ocorra a desnaturação. Posteriormente, para amplificação, submetido a 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, a 55°C por 45 segundos, a 72°C por 1 minuto e extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose (©Invitrogen) com concentração de 2,0%, corado com brometo de etídio na presença de um marcador molecular de 100 pb e analisados através do sistema de captura e análise de imagens *Alpha Imager 2000* (Alpha Innotech Corporation) (Figura 3).

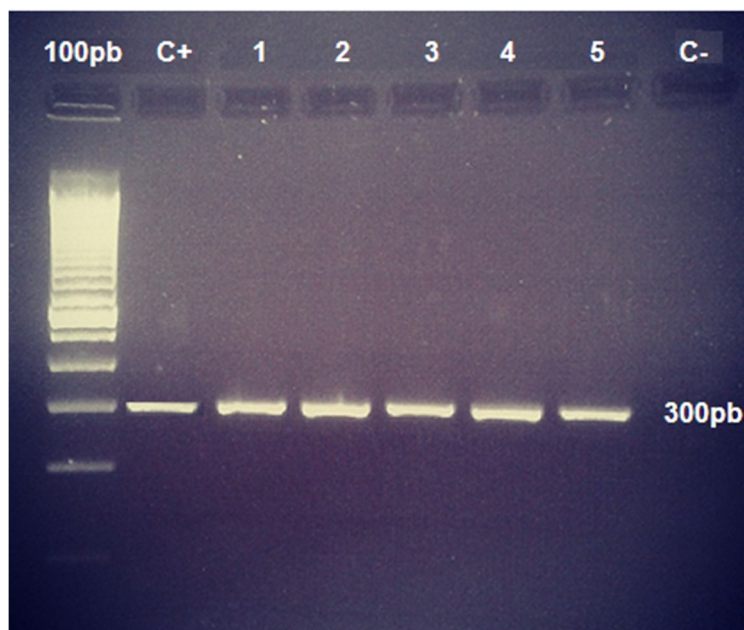


Figura 3. Padrão de migração eletroforética do gene *IL-6* na reação de PCR, fragmento de 300pb. Coluna 1: padrão molecular de 100pb; Coluna 2: Controle positivo; Colunas de 3-7: amostras de pacientes; Coluna 8: controle negativo.

Após a amplificação de todas as amostras, realizou-se a reação de digestão com a enzima de restrição *NlaIII*, técnica chamada de RFLP. Nesta reação com volume final de

20 μ L, foram utilizados 9,7 μ L de H₂O, 2 μ L de Buffer G, 0,3 μ L de enzima *Nla*III e 8 μ L de produto da reação do PCR. Os produtos encontrados são:

- Produtos de 233pb, 54pb e 13pb , alelo GG
- Produtos de 122pb, 111pb, 54pb e 13pb, alelo CC
- Produtos de 233pb, 122pb, 111pb, 54pb e 13pb, alelo CG

A visualização da digestão foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2,5%, corados com Brometo de Etídio. Na figura 4, nota-se que PA141; PA179 e PA191 são heterozigotos CG, a amostra PA149 é homozigoto CC, e que a amostra PA145 é homozigoto GG.

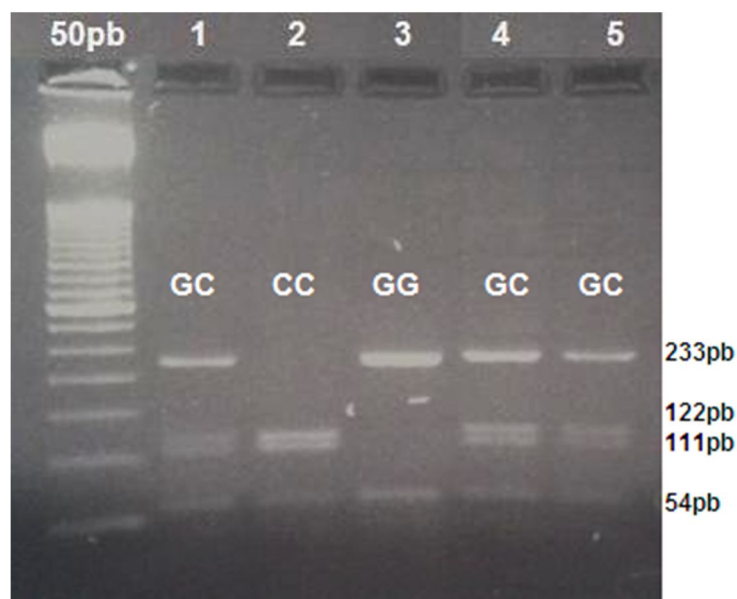


Figura 4. Padrão de migração eletroforética do gene *IL-6* na reação de PCR, após a reação de RFLP. 1= GC; 2= CC; 3=GG; 4=GC; 5=GC. Padrão molecular de 50pb. GG= homozigoto selvagem; CC= homozigoto polimórfico; GC= heterozigoto.

2.3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a comparação das frequências genótípicas e alélicas entre os grupos utilizou-se o teste exato de Fisher. 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). O Programa estatístico GraphPad InStat versão 3.0 e a ferramenta online SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) foram utilizados nas análises. Nas análises $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.4 RESULTADOS

No grupo de gastrite crônica, as frequências genótípicas para o SNP IL-6 -174 G>C para GG, GC e CC foram 45%; 45% e 10%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para G foi de 0,68 e para C de 0,32. No grupo de Câncer Gástrico as frequências genótípicas para GG, GC e CC foram de 72,5%, 20% e 7,5%, respectivamente, enquanto a frequência alélica para G foi de 0,82 e para C de 0,18. No grupo Controle obteve-se uma frequência genotípica para GG, GC e CC de 50%, 40% e 10% respectivamente, já a frequência alélica foi para G de 0,70 e para C de 0,30 (Tabela 2).

Tabela 2. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos grupos Gastrite, Câncer e Controle.

GENÓTIPOS/ ALELOS	Gastrite Crônica n(%)	Câncer Gástrico n(%)	Controle n(%)
GG	18(45%)	29(72,5%)	20(50%)
GC	18(45%)	8(20%)	16(40%)
CC	4(10%)	3(7,5%)	4(10%)
G	0,68	0,82	0,70
C	0,32	0,18	0,30
Total	40	40	40

GG= homozigoto selvagem; GC= heterozigoto; CC= homozigoto polimórfico.

As análises estatísticas entre as frequências alélicas e genótípicas para comparação dos grupos Controle, Gastrite e Câncer estão representados na **Tabela 3**. Nesta análise foi observada uma associação dos genótipos GC e/ou CC com uma menor susceptibilidade a ocorrência do câncer gástrico entre as amostras de pacientes analisadas. Como visto no modelo codominante, onde o grupo Controle possui 40% de paciente GC, e o Grupo Câncer possui apenas 20% de pacientes GC, diferença estatisticamente significativa (OR= 0,22, 95% IC = 0,07-0,71, p=0,025). No modelo dominante, o grupo Controle possui 50% de pacientes GC + CC, enquanto o grupo Câncer Gástrico possui 27,5% de pacientes GC+CC, com uma diferença estatisticamente significativa (OR= 0,27, 95%IC= 0,09-0,76, p=0,0091), demonstrando o efeito protetor destes genótipos em relação a esta neoplasia. Ao analisarmos os grupos de gastrite crônica e controle não encontramos diferenças

estatisticamente significantes. Nas análises de frequência alélica não se evidenciou diferenças relevantes como pode ser observado na Tabela 3.

Também foi realizada uma análise comparando os dois grupos casos Gastrite e Câncer gástrico, onde também se evidenciou o efeito protetor dos genótipos GC e CC entre os pacientes. No modelo codominante, onde o grupo Gastrite possui 45% de paciente GC, e o Grupo Câncer possui apenas 20% de pacientes GC, diferença estatisticamente significativa (OR= 0,28, 95% IC= 0,10-0,77, p=0,036). No modelo dominante, o grupo Gastrite possui 55% de pacientes GC + CC, enquanto o grupo Câncer Gástrico possui 27,5% de pacientes GC+CC, com uma diferença estatisticamente significativa (OR= 0,31, 95%IC= 0,12-0,79, p=0,012), confirmando o efeito protetor destes genótipos em relação a esta neoplasia. Nas análises de frequência alélica evidenciou diferença estatisticamente significativa no alelo C (OR=0,69 95%IC= 0,51-0,93, p=0,043), mostrando o efeito protetor deste alelo (Tabela 4).

Tabela 3. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante e recessivo nos grupos Controle, Gastrite e Câncer para o SNP *IL-6* -174 G/C – rs1800795.

Modelo IL-6 174G/C rs 1800795	Genótipos/ Alelos	Grupos						
		Controle n(%)	Pacientes					p
			Câncer n(%)	OR (95%CI),	p	Gastrite n(%)	OR (95%CI),	
CODOMINANTE	GG	20 (50,0)	29 (72,5)	1	0,025*	18 (45,0)	1	0,860
	GC	16 (40,0)	8 (20,0)	0,22 (0,07-0,71)		18 (45,0)	1,27 (0,49-3,26)	
	CC	4 (10,0)	3 (7,5)	0,46 (0,08-2,48)		4 (10,0)	1,35 (0,28-6,48)	
DOMINANTE	GG	20 (50,0)	29 (72,5)	1	0,009*	18 (45,0)	1	0,590
	GC + CC	20 (50,0)	11 (27,5)	0,27 (0,09-0,76)		22 (55,0)	1,28 (0,52-3,15)	
RECESSIVO	GG + GC	36 (90,0)	37 (92,5)	1	0,720	36 (90,0)	1	0,800
	CC	4 (10,0)	3 (7,5)	0,74 (0,15-3,71)		4 (10,0)	1,21 (0,27-5,42)	
ALELOS	G	0,70	0,82	1	0,093	0,68	1	0,864
	C	0,30	0,18	1,46 (0,93-2,29)		0,32	0,94 (0,68-1,31)	

OR=Odds Ratio; IC= Intervalo de Confiança; *Resultados estatisticamente significantes.

Tabela 4. Análise das frequências genotípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante e recessivo nos grupos Câncer e Gastrite para o SNP *IL-6* 174 G/C – rs1800795.

Modelo IL-6 174G/C rs 1800795	Genótipos/ Alelos	Grupos			
		Pacientes			
		Câncer n(%)	Gastrite n(%)	OR (95% CI),	P
CODOMINANTE	GG	29 (72,5)	18 (45,0)	1	0,036*
	GC	8 (20,0)	18 (45,0)	0,28 (0,10-0,77)	
	CC	3 (7,5)	4 (10,0)	0,46 (0,09-2,32)	
DOMINANTE	GG	29 (72,5)	18 (45,0)	1	0,012*
	GC + CC	11 (27,5)	22 (55,0)	0,31 (0,12-0,79)	
RECESSIVO	GG + GC	37 (92,5)	36 (90,0)	1	0,670
	CC	3 (7,5)	4 (10,0)	0,72 (0,15-3,45)	
ALELOS	G	0,82	0,68	1	0,043*
	C	0,18	0,32	0,69 (0,51-0,93)	

OR=Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança; *Resultados estatisticamente significantes.

3 DISCUSSÃO

A IL-6 é uma citocina, cujo gene está localizado no cromossomo 7p21, envolvida na regulação de diversos processos celulares, incluindo a proliferação e diferenciação celular. Esta interleucina desempenha um papel crucial na resposta inflamatória de fase aguda e no controle do equilíbrio entre vias pró e anti-inflamatórias. (GIANNITRAPANI; et al., 2013).

Além disso, a IL-6 tem sido implicada na promoção e progressão de vários tumores (HONG; et al; 2007). Modelos animais com deficiência desta interleucina demonstram uma atenuação na progressão de câncer de colon (ILIOPOULOS; et al; 2009).

Em um estudo recente, um grupo de pesquisadores avaliou a interação entre a IL-6 e a tumorigênese gástrica *in vivo*. A carcinogênese gástrica foi atenuada em camundongos *knockout* (que não produzem IL-6) em comparação com os camundongos normais, sugerindo o seu papel neste tipo tumoral (KINOSHITA; et al., 2013).

Muitos polimorfismos estão descritos no gene da *IL-6*, entretanto, estudos indicam que a presença de um polimorfismo de troca de nucleotídeo único (SNP) na região promotora do gene *IL-6* -174 G/C (rs 1800795) está relacionado com a taxa de transcrição deste gene e, por consequência no controle do nível de circulação desta interleucina. Altos níveis circulantes de IL-6 foram documentados em diversas condições clínicas alteradas, doenças neoplásicas (inflamatórias) e, em particular, em várias doenças do fígado, como hepatite viral crônica, doença hepática alcoólica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HCC). Este mesmo trabalho também menciona uma possível correlação entre a presença do polimorfismo *IL-6*-174 G/C, os níveis circulantes de IL-6 e o estágio das doenças analisadas (GIANNITRAPANI; et al., 2013). No entanto, os resultados ainda são muito controversos.

Yan et al. (2012) analisaram alguns polimorfismos no gene da *IL-6* em pacientes com esclerose múltipla (EM), entre eles, *IL-6*-597 G/A (rs1800797) e *IL-6*-174 G/C (rs1800795), mas não conseguiram uma associação entre frequência genotípica ou alélica de nenhum dos polimorfismos e a doença avaliada. (YAN J.; LIU J.; LIN, 2012). De modo contrário, foi demonstrada uma forte influencia do genótipo *IL-6*-174 GG e o carcinoma hepático em uma população não asiática do continente americano (OGNJANOVIC; et al, 2009).

Em relação ao gene IL-6, alguns trabalhos tem associado o SNP *IL-6*-174 G/C como um preditor de fadiga relacionada a diversos tipos de câncer (COLLADO-HIDALGO, et al, 2008; MIASKOWSKI, et al, 2010; REINERTSEN, et al, 2011). Um destes estudos demonstra que

os sobreviventes de câncer de mama com os genótipos GG e CC apresentaram maior fadiga do que os sobreviventes com o genótipo GC (REINERTSEN, et al., 2011), resultado que vai de encontro com os nossos dados que evidenciou uma forte associação dos heterozigotos GC e a proteção em relação ao desenvolvimento do câncer gástrico. De modo contrário, um trabalho que analisou o mesmo polimorfismo com câncer de próstata descreveu o genótipo homozigoto selvagem SNP *IL6-174 GG* como protetor para a fadiga (JIM; et al., 2012).

Resultados controversos em relação ao genótipo de risco são congruentes com a literatura conflitante em relação ao polimorfismo *IL6-174* como um preditor de outras patologias. Vários estudos têm relatado que o alelo C está associada a uma maior circulação de IL-6, embora outros estudos não encontraram nenhuma diferença ou com menor circulação de IL-6 entre os portadores do alelo C (JIM; et al., 2012).

Para Pooja et al. (2012) o alelo mutante para o SNP *IL-6-174 GC* (rs1800795) conferiu proteção para o câncer de mama, já que os controles apresentaram uma maior frequência de ambos os alelos mutantes e genótipos CC (POOJA; et al., 2012).

Assim, após uma análise bibliográfica evidencia-se que ainda existe uma grande divergência de resultados em relação a associação do polimorfismo *IL-6-174 G/C* e doenças inflamatórias e tumorais. Poucos são os estudos em carcinogênese gástrica, demonstrando a importância deste projeto que busca a associação com doenças pépticas na população brasileira.

4 CONCLUSÕES

- Os genótipos do polimorfismo da IL-6 (-174 G>C) (rs 1800795) GG, GC e CC foram genotipados em pacientes com adenocarcinoma gástrico (72,5%, 20% e 7,5%, respectivamente), gastrite crônica (45%; 45% e 10%, respectivamente), e em pacientes saudáveis (50%, 40% e 10%, respectivamente).
- Após genotipar o polimorfismo da IL-6 (-174 G>C) (rs 1800795) em pacientes com adenocarcinoma gástrico, gastrite crônica e em pacientes saudáveis, o estudo revelou uma associação protetora dos genótipos GC e CC da IL-6 -174 e o risco de câncer gástrico na população estudada.

No entanto, novas investigações poderiam fornecer uma melhor compreensão do papel desta variante genética na etiologia da *H. pylori* e carcinogênese gástrica.

REFERÊNCIAS

ANDO T, KUSUGAMI K, OHSUGA M, et al. Differential normalization of mucosal interleukin-8 and interleukin-6 activity after *Helicobacter pylori* eradication. *Infect Immun*. Oct;66(10):4742-7. 1998. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746573>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

CHELI, R.; GIACOSA A. Chronic atrophic gastritis and gastric mucosal atrophy--one and the same. *Gastrointest Endosc*, v. 29, p. 23-25, 1983. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6826003>> Acesso em: 13 jan. 2013.

CHIESA C, PACIFICO L, ANANIA C, et al. *Helicobacter pylori* therapy in children: overview and challenges. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 23:405-416, 2010. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646336>> Acesso em: 13 jan. 2013.

COLLADO-HIDALGO A, BOWER JE, GANZ PA, et al. **Cytokine gene polymorphisms and fatigue in breast cancer survivors: Early findings**. *Brain Behav Immun*. 22:1197-1200,2008.

CRABTREE JE, WYATT LK, TREJDOSIEWICS P, et al. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J. Clin. Pathol*. 47:61-66, 1994. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132812>> Acesso em: 12 jan. 2013.

DIXON MF, GENTA RM, YARDLEY JH, et al. **Classification and grading of gastritis**. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996.

EL-OMAR EM; RABKIN CS, GAMMON MD, VAUGHAN TL, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003 May;124(5):1193-201. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730860>> Acesso em: 13 jan. 2013.

EL-OMAR EM. The importance of Interleukin-1B in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 48:743-747, 2001. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358884>> Acesso em: 13 jan. 2013.

EL-OMAR, EM. Mechanisms of increased acid secretion after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, v. 55, n. 2, p. 144-6, 2006. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1856493/>> Acesso em: 13 jan. 2013.

FOX, J.G.; WANG, T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*, v. 117, p. 60-69, 2007. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200707>> Acesso em: 16 jan. 2013.

GIANNITRAPANI L., SORESI M., BALASUS D., et al. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. April 28; 19(16) : 2449-2455, 2013. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674845>> Acesso em: 20 jan. 2014.

HANSSON LE, NYREN O, HSING AW. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med*, 335:242-249, 1996. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657240>> Acesso em: 16 jan. 2013.

HONG DS, ANGELO LS, KURZROCK R, et al. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 110: 1911–1928. 2007. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17849470>> Acesso em: 18 jan. 2013.

ILIOPOULOS D, HIRSCH HA, STRUHL K. An epigenetic switch involving NFkappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139: 693–706. 2009. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878981>> Acesso em: 18 jan. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em <<http://www.inca.org.br>. Acesso em: 03 fev. 2014.

JERRIS R.C. **Helicobacter In: Manual of Clinical Microbiology**. Sixth Edition, AMS Press Washington, D.C. 1995.

JIM HSL, PARK JY, PERMUTH-WEY J, et al, Genetic Predictors of Fatigue in Prostate Cancer Patients Treated with Androgen Deprivation Therapy: Preliminary Findings. *Brain Behav Immun*, 26(7): 1030–1036, Oct 2012. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399038/>> Acesso em: 25 jun. 2014.

KAZEMI S, TAVAKKOLI H, HABIZADEH MR, et al. Diagnostic values of *Helicobacter pylori* diagnostic tests: stool antigen test, urea breath test, rapid urease test, serology and histology. *J Res Med Sci*. 2011 Sep;16(9):1097-104. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3430034/>. Acesso em: 12 jan. 2013.

KIM SH, SIERRA RA, MCGEE DJ, et al. Transcriptional profiling of gastric epithelial cells infected with wild type or arginase-deficient *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol.* 2012 Aug 13;12:175. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3438056/>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

KINOSHITA H, HIRATA Y, NAKAGAWA H, et al. Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis. *PLoS One.* 2013 Apr 12;8(4):e60914. doi: 10.1371/journal.pone.0060914. Print 2013. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23593346>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

KONTUREK P.C.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T. *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis. *J Physiol Pharmacol*, v. 60, p. 3-21, 2009. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826177>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

KUMAR V., ABBAS A.K., FAUSTO N. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro : *Elsevier*, 2005.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, v. 64, p. 31-49, 1965. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14320675>> . Acesso em: 13 jan. 2013.

LAUTA VM. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine* 16:79-86, 2001. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741345>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

LEE SA, CHOI SR, JANG JS, et al. A expressão do VEGF, EGFR, e de IL-6 em adenomas e adenocarcinomas gástrico por dissecação endoscópica submucosa. *J Biol Chem.* 2010 May 21;285(21):16042-50. doi: 10.1074/jbc.M110.111054. Epub 2010.

LEE I. Critical pathogenic steps to high risk *Helicobacter pylori* gastritis and gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 7;20(21):6412-6419. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914362>>. Acesso em: 28 jun. 2014.

LUKASZEWICZ-ZAJĄC M, MROCZKO B, GRYKO M, et al. Comparison between clinical significance of serum proinflammatory proteins (IL-6 and CRP) and classic tumor markers (CEA and CA 19-9) in gastric cancer. *Clin Exp Med.* 2011 Jun;11(2):89-96. doi: 10.1007/s10238-010-0114-5. Epub 2010. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938721>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

MATSUO T, IKURA Y, OHSAWA M, et al. Mast cell chymase expression in *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Histopathology*. Dec;43(6):538-49, 2003. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636254>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

MAYNE ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr*, 133:933S-940S, 2003. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612179>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

MIASKOWSKI C, DODD M, LEE K, et al. **Preliminary evidence of an association between a functional interleukin-6 polymorphism and fatigue and sleep disturbance in oncology patients and their family caregivers.** *J Pain Symptom Manage*. 40:531–544, 2010.

MORGAN D, KRAFT W, BENDER M, et al. Nitrofurans in the treatment of gastritis associated with *Campylobacter pylori*. *Gastroenterology*. 95:1178–1184, 1988. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3049213>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

NAOUM, PC. **Citocinas e Interleucinas.** Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP, Novembro de 2009. Disponível em: < <http://www.ciencianews.com.br>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

OGNJANOVIC S., YUAN J.M., CHAPTMAN A.K., et al. Genetic polymorphisms in the cytokine genes and risk of hepatocellular carcinoma in low-risk non-Asians of USA. *Carcinogenesis*; 30: 758-762 [PMID: 19126646 DOI: 10.1093/carcin/bgn286], 2009. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3049213>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

PACIFICO L, ANANIA C, OSBORN JF, et al. Consequences of *Helicobacter pylori* infection in children. *World J Gastroenterol*. November 7; 16(41): 5181-5194, 2010. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049552>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

PEEK RM JR, FISKE C, WILSON KT. Role of Innate Immunity in *Helicobacter pylori* – Induced Gastric Malignancy. *Physiol Rev*. 90: 831-858, 2010; doi: 10.1152/physrev.00039.2009. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664074>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

POOJA S, CHAUDHARY P, NAYAK LV, et al. Polymorphic variations in IL-1 β , IL-6 and IL-10 genes, their circulating serum levels and breast cancer risk in Indian women. *Cytokine*. 2012 Oct;60(1):122-8. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22818022>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

RAFIEI A, HOSSEINI V, JANBABAI G, et al. DS. Inducible nitric oxide synthetase genotype and *Helicobacter pylori* infection affect gastric cancer risk. *World J Gastroenterol*. 2012 Sep 21;18(35):4917-24. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3447275/>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

REINERTSEN KV, GRENAKER ALNAES GI, LANDMARK-HOYVIK H, et al. **Fatigued breast cancer survivors and gene polymorphisms in the inflammatory pathway**. *Brain Behav Immun*.25:1376–1383, 2011.

TAHARA, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. In: BUFFER, P., RICE, J., BIRD, M., BOFFETTA, P. eds. **Mechanisms of carcinogenesis: Contribution of molecular epidemiology**. Lyon: IARC Scientific Publications, n.157, 2004.

TAKEUCHI H, ZHANG YN, ISRAEL DA, et al.. Effect of *Helicobacter pylori* cdrA on interleukin-8 secretions and nuclear factor kappa B activation. *World J Gastroenterol*. Feb 7;18(5):425-34, 2012. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3270507/>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

TERRY CF, LOUKACI V, GREEN FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000 Jun 16;275(24):18138-44. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747905>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

TSENG FC, BROWN EE, MAIESE EM, et al. Polymorphisms in cytokine genes and risk of *Helicobacter pylori* infection among Jamaican children. *Oct*;11(5):425-30, 2006. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16961803> >. Acesso em: 13 jan. 2013.

YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA T, et al. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Helicobacter*, 6:116-124, 1997. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9391240>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA Y, et al. Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. Gastroenterology 110:1744-1752, 1996. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8964399>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

YAMAOKA Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. J Med Microbiol. 57:545-553, 2008. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8964399>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

YAN J., LIU J., LIN C.Y., et al. Interleukin-6 Gene Promoter-572 C Allele may Play a Role in Rate of Disease Progression in Multiple Sclerosis. Int J Mol Sci.; 13(10): 13667-13679, 2012. **Pubmed.gov**, c2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3497346/>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DA IL-6 (-174 G>C) E SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO COM O HELICOBACTER PYLORI E O CÂNCER GÁSTRICO

Pesquisador: Juliana Garcia de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26799814.1.0000.5502

Instituição Proponente: Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 541.172

Data da Relatoria: 25/02/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO DA IL-6 (-174 G>C) E SUA POSSÍVEL CORRELAÇÃO COM O HELICOBACTER PYLORI E O CÂNCER GÁSTRICO" está de acordo com as premissas deste Comitê de Ética em pesquisa. O estudo é relevante e envolve um aluno de iniciação científica. É relevante, o TCE está claro e contém todas as informações necessárias. As amostras empregadas no estudo já foram coletadas, portanto sem nenhum risco e permite sua execução no período descrito pelos autores.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar se existe correlação entre o polimorfismo da IL-6 com o desenvolvimento de carcinoma gástrico associado à infecção por *Helicobacter pylori*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos já que serão empregadas neste estudo amostras já coletadas: biópsias confirmadas para carcinoma gástrico, úlcera e mucosa normal obtidas por endoscopia de portadores confirmados para a presença de *H. pylori*.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado, relevante e que não levanta questões éticas na pesquisa com seres humanos.

Endereço: Pós-Graduação em Pesquisa e Pós-Graduação
 Bauru - Rua Irmã Aminda Nº 10-50 CEP: 17.011-160
 UF: SP Município: BAURU
 Telefone: (14)21.07.7260 E-mail: prppg@usc.br

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO



Continuação do Parecer: 541.172

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram preenchidos e redigidos de forma satisfatória. Porém, no termo de compromisso os autores relatam que informações de prontuários devem ser disponibilizadas e na planilha de informações básicas consta que o prontuário não será utilizado.

Recomendações:

Ajustar as informações na planilha básica, relatando que o prontuário do paciente ficará disponível para este ou para estudos futuros.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero o projeto aprovado, porém que seja encaminhada a sugestão para ajuste das informações sobre a utilização do prontuário nas informações básicas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BAURU, 25 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Rodrigo Ricci Vivan
(Coordenador)

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Neste momento você está tendo a opção de participar de um estudo onde se investigam os marcadores de patogenicidade da bactéria denominada *Helicobacter pylori* e o envolvimento de alguns genes humanos na doença gástrica.

Eu, _____
 RG: _____, CPF: _____ nascido em
 ____/____/____ e domiciliado no município de
 _____, ou seu responsável legal
 _____, abaixo assinado, aceito participar
 do estudo especificado, como voluntário nos projetos de pesquisa **“Polimorfismos gênicos de receptores toll like (TLR) envolvidos no processo inflamatório do *Helicobacter pylori* e carcinogênese gástrica e avaliação de alterações na expressão gênica” e “Caracterização do marcador de patogenicidade *dupA*, do *Helicobacter pylori* e análise da expressão dos genes do fator de necrose tumoral e e-caderina em amostras de crianças e adultos com sintomas pépticos”**, e em extensões destes, que pretendem estudar a ocorrência de alterações no material genético (DNA e RNA), que possam estar envolvidas no processo inflamatório provocado pelo *Helicobacter pylori*, frequentemente presente em indivíduos com sintomas pépticos de estômago. Declaro que o voluntário ou responsável foi satisfatoriamente esclarecido que:

- A) o estudo será realizado utilizando amostras de biópsia gástrica colhidas durante o processo de rotina de endoscopia realizado pelo médico responsável, no Hospital Estadual de Bauru;
- B) não haverá nenhum risco adicional para sua saúde, sendo que em eventuais situações o paciente terá total apoio médico, hospitalar e psicológico;
- C) autoriza a coleta de dados em seu prontuário médico;
- D) o voluntário pode consultar os pesquisadores responsáveis em qualquer época para esclarecimento de qualquer dúvida;

E) está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e que não precisa apresentar justificativas para isso;

F) todas as informações fornecidas pelo voluntário e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e que estes últimos serão utilizados somente para divulgação em reuniões e revistas científicas, sem sua identificação, pois o material coletado será identificado por código;

G) os resultados obtidos serão analisados com cálculos estatísticos em grupo, assim não serão fornecidos resultados individuais, pois a pesquisa tem valor científico coletivo;

H) o material genético obtido (RNA e DNA) das amostras coletadas será armazenado em freezer no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Humana da Universidade do Sagrado Coração- USC e poderá ser utilizado para pesquisas futuras, também sem a identificação do indivíduo;

I) este estudo consiste numa pesquisa científica importante, pois seus resultados poderão trazer informações que possam auxiliar o esclarecimento de diferenças genéticas individuais, juntamente com fatores do estilo de vida (como a dieta alimentar, consumo de álcool e cigarro), que possam acarretar um maior risco no desenvolvimento de doenças gástricas. Assim, podendo auxiliar futuramente na indicação de grupos de risco para essa doença.

Assim, o usuário consente em participar do projeto de pesquisa em questão.

Bauru, ____ de _____ de 2013

Usuário/ responsável legal

Pesquisador responsável