

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

GIOVANA MELEIRO BOVOLINI

**A DELEÇÃO GÊNICA *TLR2* -196 PARA -174 E
SUAS IMPLICAÇÕES NA INFECÇÃO PELO
Helicobacter pylori NA CARCINOGENESE
GÁSTRICA E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA**

BAURU
2016

GIOVANA MELEIRO BOVOLINI

**A DELEÇÃO GÊNICA *TLR2* -196 PARA -174 E
SUAS IMPLICAÇÕES NA INFECÇÃO PELO
Helicobacter pylori NA CARCINOGENESE
GÁSTRICA E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA**

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
2016

Bovolini, Giovana Meleiro

B783d

A deleção gênica *TLR2* -196 para -174 e suas implicações na infecção pelo *Helicobacter pylori* na carcinogênese gástrica e avaliação da expressão gênica /Giovana Meleiro Bovolini-- 2016.

50f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira.

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

1. *Toll-like*. 2. *Helicobacter pylori* 3. Polimorfismo. 4. Expressão gênica. I. Oliveira, Juliana Garcia. II. Título.

GIOVANA MELEIRO BOVOLINI

**A DELEÇÃO GÊNICA *TLR2* -196 PARA -174 E SUAS
IMPLICAÇÕES NA INFECÇÃO PELO *Helicobacter pylori* NA
CARCINOGENESE GÁSTRICA E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA**

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 Prof^a. Dr^a. Juliana Garcia de Oliveira.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rita Luiza Peruquetti
Universidade Sagrado Coração

Prof^a. Dr^a. Juliana Garcia de Oliveira
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 30 de Novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Marcos e Lúcia, e meu irmão Fellipe, por todo o amor, incentivo, apoio e dedicação, onde com eles desabafei e compartilhei cada momento, sempre me motivando e dando confiança. Muito obrigada!

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

À Prof^a. Dr^a. Juliana Garcia de Oliveira pela orientação e por me proporcionar oportunidade para desenvolver a pesquisa enriquecendo minha formação.

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

À Prof^a. Dr^a. Rita Luiza Peruquetti por ter aceitado o convite para avaliar meu trabalho.

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

À FAPESP pelo auxílio disponibilizado para a realização de todo o projeto.

Agradeço a Deus, pela oportunidade de conviver com pessoas especiais durante todo esse período e pela dádiva de sonhar e realizar!

“Não adianta dizer: Estamos fazendo o melhor que podemos. Temos que conseguir o que quer que seja necessário.”

Winston Churchill

RESUMO

Atualmente o câncer gástrico representa o quarto tumor maligno mais frequente no mundo, sendo o segundo com relação a mortalidade. Estudos comprovam que fatores genéticos e ambientais são determinantes para o desenvolvimento de patologias gástricas. Assim, tem-se avaliado a associação de polimorfismos gênicos de fatores envolvidos no processo inflamatório, os quais podem modular o padrão de resposta imune do hospedeiro. É o caso dos receptores conhecidos como *Toll like (TLR)*, que reconhecem padrões moleculares associados aos micro-organismos. Este estudo dividiu-se em duas etapas, na primeira parte 475 amostras gástricas foram genotipadas pela técnica de PCR-alelo específico para o polimorfismo *TLR2* deleção -196 para 174 (61 amostras de Câncer Gástrico - CG; 239 amostras de Gastrite Crônica - GC e 175 amostras de pacientes Controle - C) e na segunda etapa foi realizada a avaliação da expressão gênica do RNAm por PCR real time, para qual foram utilizadas amostras de RNA de 23 pacientes com CG, 48 pacientes com GC e 14 pacientes C. As frequências genotípicas para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL foram 74%, 21% e 5%, respectivamente, no grupo CG, enquanto as frequências alélicas para INS foi de 0,84 e para DEL de 0,12. No grupo GC as frequências genotípicas para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL foram de 77%, 21% e 2%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para INS foi de 0,88 e para DEL de 0,12. No grupo C obteve-se uma frequência genotípica para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL de 73%, 26% e 1% respectivamente, já a frequência alélica foi para INS de 0,86 e para DEL de 0,14. Nas análises de frequências genotípica e alélicas não se evidenciou diferenças relevantes. Para avaliar a associação do polimorfismo *TLR2* del com a presença do *H. pylori*, comparou-se as frequências genotípicas e alélicas de pacientes *H. pylori* negativo (n= 267 pacientes) e *H. pylori* positivo (n= 208 pacientes). As frequências genotípicas no grupo *H. pylori* positivo para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL foram de 75%, 23% e 12% respectivamente, enquanto a frequência alélica para INS foi de 0,87 e para DEL foi de 0,13; já para o grupo de *H. pylori* negativo foram de 74%, 22% e 4%, respectivamente, enquanto a frequência alélica para INS foi de 0,85 e para DEL foi de 0,15. Nas análises de expressão gênica relativa obteve-se para o grupo CG uma mediana de RQ= 1,05, para GC RQ=0,81 e para C RQ=0,61, sendo que não houve diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos analisados, C vs CG (p=0,07), C vs GC (p=0,26) e CG vs GC (p=0,18). O mesmo resultado foi visto na comparação entre o grupo de pacientes *H. pylori* positivo (RQ= 0,92) e pacientes *H. pylori* negativo (RQ=0,92), p=0,19. Assim, as correlações entre as amostras de CG, GC e C nos três modelos de agrupamento genotípico (codominante, dominante e recessivo) não evidenciou diferenças estatisticamente relevantes entre a deleção gênica e as lesões gástricas avaliadas nesta amostra populacional. Nas análises de expressão gênica, também não houve alteração nos níveis de expressão do gene *TLR2* entre os grupos avaliados.

Palavras-chave: Toll-like. *Helicobacter pylori*. Polimorfismo. Expressão gênica.

ABSTRACT

Nowadays gastric cancer represents the fourth most frequent malignant tumor in the world, being the second with relation to mortality. Studies prove that genetic and environmental factors are determining to the development of gastric pathologies. The association of gene polymorphisms of factors involved in the inflammatory process has been evaluated since they can modulate the host's immune response pattern. This is the case of the Toll-like receptors (TLR) which recognize the molecular patterns associated with microorganisms. This study was divided in two stages: in the first stage, 475 gastric samples were genotyped by the Allele-specific PCR for the *TLR2* polymorphism deletion -196 to 174 (61 samples of gastric cancer – GC; 239 samples of chronic gastritis – CG and 175 samples of control patients – C) and in the second stage, an mRNA gene expression evaluation was performed through real time PCR, in which we used the RNA samples of 48 patients with chronic gastritis, 23 patients with gastric cancer and 14 control patients. The INS/INS, INS/DEL and DEL/DEL genotypic frequencies were equal to 77%, 21%, and 2%, respectively, in the GC group, while the allele frequency for INS was equal to 0.88 and for DEL 0.12. In the GC group, the INS/INS, INS/DEL and DEL/DEL genotypic frequencies were equal to 74%, 21% and 5%, respectively, while the allele frequency for INS was equal to 0.84 and for DEL 0.12. In the C group, the INS/INS, INS/DEL, and DEL/DEL genotypic frequencies were equal to 73%, 26% and 1%, respectively, while the allele frequency for INS was equal to 0.86 and for DEL 0.14. No relevant differences were verified in the analysis of the genotypic and allele frequencies. To evaluate the DEL *TLR2* polymorphism association with the presence of *H. pylori*, the genotypic and allele frequencies of *H. pylori* negative patients (n=267 patients) and *H. pylori* positive patients (n= 208 patients) were compared. The INS/INS, INS/DEL and DEL/DEL genotypic frequencies on the *H. pylori* positive group were equal to 75%, 23% and 12%, respectively, while the allele frequency for INS was equal to 0.87 and for DEL, 0.13. In the *H. pylori* negative group, the INS/INS, INS/DEL and DEL/DEL genotypic frequencies were equal to 74%, 22%, and 4%, respectively, while the allele frequency for INS was equal to 0.85 and for DEL 0.15. In the relative gene expression analysis, the average for the C group was QR=0.61, QR=1.05 for the GC group and QR=0.81 for the CG group, presenting no statistically significant differences in the comparison between the analyzed groups, C vs GC (p=0.07), C vs CG (p=0.26) and GC vs CG (p=0.18). The same result was observed in the comparison between the *H. pylori* positive patients group (QR=0.92) and the *H. pylori* negative patients group (QR=0.92), p=0.19. Consequently, the correlations between the GC, the CG and the C samples on the three genotypic grouping models (codominant, dominant and recessive) presented no statistically significant differences between the gene deletion and the gastric lesions evaluated in this population sampling. In the gene expression analysis, there were also no changes in the expression level of the *TLR2* gene amount the groups.

Key-words: Toll-like. *Helicobacter pylori*. Polymorphism. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Anatomia do estômago.....12
- Figura 2 - Influências ambientais no processo de carcinogênese gástrica.....16
- Figura 3- Padrão de migração eletroforética do gene *HPX* na reação de PCR, fragmento de 150pb. Colunas 1, 2, 6, 7 e 8: amostras de pacientes positivos para o gene do *HPX*; Colunas 3,4 e 5: amostras de pacientes negativos para o gene do *HPX*. Padrão molecular de 100pb.....23
- Figura 4 - Padrão eletroforético dos fragmentos gerados pela técnica de PCR-alelo específico para o gene *TLR2* deleção -196 para 174 de 286-264 pb. Coluna 1,5,6: *INS/INS*. Coluna 2: *DEL/DEL*. Coluna 3 e 4: *INS/DEL*.....24
- Figura 5 - Níveis de expressão gênica relativa para o gene *TLR2* . A) Comparação de mediana de RQ dos grupos Gastrite Crônica e Controle ($p=0,2697$); B) Comparação de mediana de RQ dos grupos Câncer Gástrico e Controle ($p=0,0781$) e C) Comparação de mediana de RQ dos grupos Câncer Gástrico e Gastrite Crônica ($p=0,1876$). Diferença estatisticamente significativa $p<0,05$. RQ=Quantificação Relativa. Tratamento de outliers.....32
- Figura 6 - Níveis de expressão gênica relativa para o polimorfismo *TLR2-196 para-174 INS/DEL*, comparação entre os portadores do genótipo selvagem *INS/INS* e da associação dos portadores da deleção gênica (*INS/DEL + DEL/DEL*). A) Grupo Controle ($p=0,5338$); B) Grupo Câncer Gástrico ($p=0,2269$). C) Grupo Gastrite Crônica ($p=0,1467$). Diferença estatisticamente significante $p<0,05$. Tratamento de outliers.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total de amostras de DNA e RNA dos grupos casos (GC e CG) e controle (C).....	21
Tabela 2 - Descrição dos indivíduos dos grupos de câncer gástrico (CG), gastrite crônica (GC) e controle (C) segundo as variáveis: sexo e idade (anos) e <i>Helicobacter pylori</i> (positivo e negativo).....	22
Tabela 3 - Polimorfismo <i>TLR2 del 196 para 174</i> e sua sequência de <i>primers</i> conforme referências da literatura.....	23
Tabela 4 - Frequências Genotípicas e Alélicas nos grupos Controle, Câncer e Gastrite para o polimorfismo <i>TLR2 -196 para -174</i>	27
Tabela 5 - Análise das frequências genotípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante e recessivo nos grupos Controle VS Gastrite para o polimorfismo <i>TLR2 -196 para -174</i>	27
Tabela 6 - Análise das frequências genotípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante e recessivo nos grupos Controle VS Câncer para o polimorfismo <i>TLR2 -196 para -174</i>	28
Tabela 7 - Análise das frequências genotípicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e frequência alélica nos grupos Câncer VS Gastrite para o polimorfismo <i>TLR2 del -196 para -174</i>	29
Tabela 8 - Análise das frequências genotípicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e frequência alélica nos grupos <i>H. pylori</i> positivo vs <i>H. pylori</i> negativo para o polimorfismo <i>TLR2 del -196 para -174</i>	30
Tabela 9 - Níveis de expressão gênica relativa de <i>TLR2</i> para os grupos de Gastrite Crônica-GC, Câncer Gástrico-CG e Controle-C.....	31
Tabela 10 - Níveis de expressão gênica relativa para o gene <i>TLR2</i> para os grupos de <i>H. pylori</i> positivo e <i>H. pylori</i> negativo.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.1 <i>Helicobacter pylori</i> e a Carcinogênese gástrica	14
2.1.2 Receptores Toll-Like.....	17
2.2 OBJETIVOS	19
2.3 METODOLOGIA.....	20
2.3.1 Casuística	20
2.3.2 Estudo Molecular	22
2.3.3 Análises Estatística	25
2.4 RESULTADOS	26
2.4.1 Análise do Polimorfismo.....	26
2.4.1 Análise de Expressão Gênica.....	31
3 DISCUSSÃO	35
4 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO	47
ANEXO B – QUESTIONÁRIO E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	48

1 INTRODUÇÃO

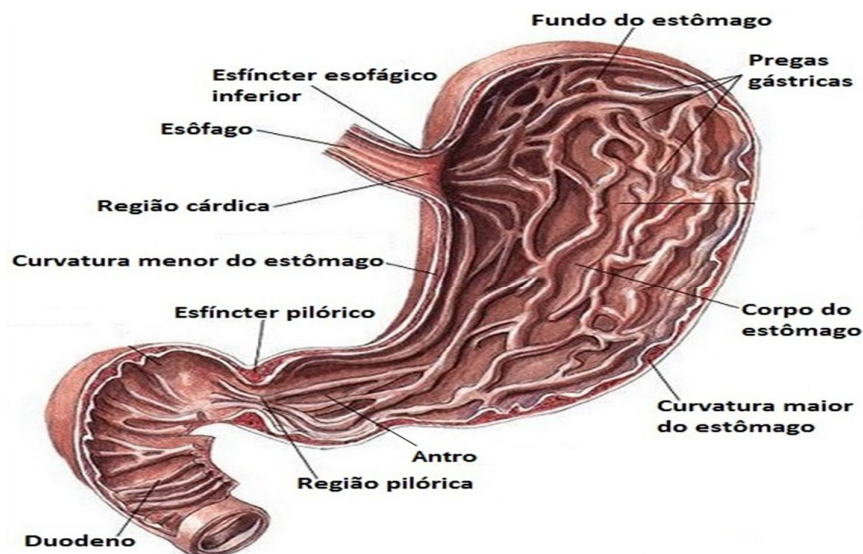
Segundo o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa para novos casos de câncer gástrico no Brasil é de 20.520, entre eles 12.920 homens e 7.600 mulheres, sendo que esses tumores aparecem em terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto, entre as mulheres. (INCA, 2016). Esse dado é realmente preocupante uma vez que quando diagnosticado em estágio avançado, a doença é usualmente incurável. (ZHANG *et al.*, 2008).

Comumente denominado câncer gástrico, os tumores de estômago apresentam-se na forma de três tipos histológicos: o adenocarcinoma, que é responsável por 90% a 95% dos tumores, e cerca de 5% a 10% compreendem o restante, que incluem linfomas e leiomiossarcoma, esse último iniciado em tecidos que dão origem aos ossos e músculos. (RICHMAN *et al.*, 2016).

O adenocarcinoma gástrico apresenta etiologia complexa, na qual fatores genéticos e ambientais estão envolvidos, caracterizando um modelo multifatorial e sua ocorrência vem sendo associada a diversos fatores como bactérias, vírus, hábitos de vida e fatores genéticos e dietéticos. Entre estes últimos, está o consumo elevado de sal e álcool, fumo, cirurgia gástrica anterior, histórico de lesões gástricas e infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*. (CORREA, 2004; KONTUREK, KONTUREK e BRZOZOWSKI, 2009; WU *et al.*, 2010; ZABALETA, 2012).

O estômago é um órgão sacular dividido em cinco regiões anatômicas, a cárdia, o fundo, o corpo, o antro e o piloro. 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. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Figura 1 – Anatomia do estômago



Fonte: Atlas de Anatomia humana – Sistema Digestório. Disponível em <<http://atlasdeanatomiahumano.blogspot.com.br/2013/04/sistema-digestorio.html>>.

A partir da descoberta do *H. pylori* em 1983, sua relação com doenças gástricas começou a ser demonstrada, sendo a única bactéria a ser classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como carcinogênica classe I. (OHBA R, IJIMA K., 2016). Este patógeno encontra-se envolvido com o processo inflamatório da mucosa do estômago estando, portanto, associado com a gastrite crônica, as úlceras pépticas, a metaplasia intestinal e com os adenocarcinomas do estômago (ISRAEL; PEEK, 2006). Na gastrite crônica, as lesões vão desde 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), motivo pelo qual é considerada uma lesão pré-maligna (GENTA, 1998).

Assim, muitos pesquisadores têm focado seus estudos nestas lesões pré-malignas e na patogênese do *H. pylori*, na tentativa de diagnósticos mais precoces. (TAKAISHI, OKUMURA e WANG, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2013).

Os receptores “*Toll-Like*” (*TLRs* - receptor de lipoproteínas bacterianas) foram identificados pela primeira vez em 1985 como componentes no desenvolvimento embrionário da *Drosophila*. (ARBOUR *et al.*, 2000), determinando a polaridade dorsoventral na embriogênese dessas moscas. (SUZUKI *et al.*, 2002). Posteriormente, a função dos *TLRs* foi associada à resposta imune contra fungos. (ARBOUR *et al.*, 2000), bactérias. (ANDERSON, 2000), e também na resistência a doenças. (MUZIO e MANTOVANI, 2000).

Estes receptores exercem a função de discriminar os diferentes patógenos, tanto em vertebrados como em invertebrados, e estão envolvidos em um sistema de sinalização que é conservado em mamíferos, aves, insetos e plantas. (BAUER *et al.*, 2001).

Atualmente, sabe-se que os *TLRs* são importantes componentes da imunidade inata, presentes nas células de defesa do hospedeiro e responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) que são expressos em agentes infecciosos. A ativação destes receptores leva a geração de sinais, e conseqüente produção de citocinas inflamatórias e o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz. Sua estimulação não só conduz à ativação da imunidade inata, mas também instrui o desenvolvimento de antígeno específico para a imunidade adquirida. (SOARES, 2013).

Alguns genes desses receptores têm sido descritos como polimórficos, também confirmando que os *TLR2* estão envolvidos na resposta a infecção pelo *H. pylori*. (ARBOUR *et al.*, 2000; OLIVEIRA e SILVA, 2012; KAUPPILA *et al.*, 2012). Há evidências que *TLR2* também é expresso em células epiteliais gástricas infectadas pelo *H. pylori*. Assim, polimorfismos em *TLR2*, *TLR4* e *CD14*, por exemplo, podem afetar a magnitude da resposta do hospedeiro contra o *H. pylori* levando a resultados graves em longo prazo, tais como câncer gástrico. (CASTAÑO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 *Helicobacter pylori* e a Carcinogênese gástrica

O *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa, de formato bacilar, adquirido na infância e que coloniza o estômago durante quase toda a vida do hospedeiro. (SMITH *et al.*, 2016). Sua infecção continua sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, pois aumenta cerca de seis vezes a incidência desse tipo de câncer. Segundo HWANG e colaboradores (1994), o câncer gástrico evolui a partir da transformação a longo prazo da mucosa gástrica, onde fatores exógenos como dieta excessiva de sal, nitritos, nitratos, amido, fumo, favorecem a irritação da mucosa gástrica. Mas também existem agentes anti-oxidantes presentes em frutas e vegetais, tais como a vitamina E o ácido ascórbico que podem atuar como fatores de proteção na carcinogênese gástrica, inibindo a produção dessas substâncias que causariam danos à mucosa gástrica.

A infecção pelo *Helicobacter pylori* continua sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico devido a sua forte tendência à cronicidade, bem como o importante papel desse micro-organismo na patogênese de úlceras gastroduodenais e linfomas. Assim, a infecção por esse patógeno está associada a mutações esporádicas em células somáticas, resultado de uma longa exposição da mucosa gástrica ao processo inflamatório causado pelo micro-organismo, adquirido na infância, que leva à atrofia, metaplasia, displasia e, posteriormente ao câncer. (CORREA, 2004).

Estudos recentes mostraram que a infecção pelo *H. pylori* alterou significativamente a microbiota gástrica e intestinal de camundongos, realçando a perturbação simbiótica entre as populações microbianas. (KIENESBERGER, *et al.*, 2016). Outro estudo também demonstrou um aumento significativo da quantidade de *H. pylori* em pacientes com câncer gástrico, assim como uma microbiota diversificada, essas com potenciais atividades de desenvolvimento de patologias gástricas. (WANG *et al.*, 2016).

A resposta imune do hospedeiro demonstra-se crucial para a indução de atividades patogênicas no desenvolvimento de doença gástrica, pois existem

evidências substanciais que indicam diferenças genéticas do *H. pylori* no resultado clínico de uma infecção, sendo particularmente de genes relacionados à virulência como, *cagA*, *vacA*, *iceA*, *babA* e *dupA*. (BECKERT *et al.*, 2016). A infecção por uma cepa *cagA* positiva está ligada com a redução de apoptose, enquanto a *cagA* negativa possui um mecanismo contrário associando-se ao aumento da apoptose, *cagA* pode agir para inibição da morte celular programada gástrico-epitelial. (OHBA R, IJIMA K., 2016).

O gene *vacA* codifica uma citocina vascular (*vacA*), que estimula células epiteliais, à apoptose. Os seres humanos infectados por *H. pylori* que expressa *vacA*, demonstram um maior grau de gastrite. O *iceA* é induzida pelo contato com o epitélio e compreende duas variantes principais *iceA1*, é regulada pelo contato com o *H. pylori* e células epiteliais gástricas humanas, e em algumas populações está relacionada com a úlcera péptica; e *iceA2* que tem sua função ainda é indefinida. (BECKERT *et al.*, 2016).

Já o gene *babA* codifica uma proteína da membrana externa, que possui a função de se aderir firmemente as células epiteliais gástricas, onde o acúmulo de *babA* pode influenciar na gravidade da doença. Portanto, pessoas infectadas por cepas de *H. pylori* que possuam *babA*, *vacA* e *cagA* expressas tem um maior risco para o desenvolvimento do câncer gástrico. (SMITH *et al.*, 2006; BECKERT *et al.*, 2016).

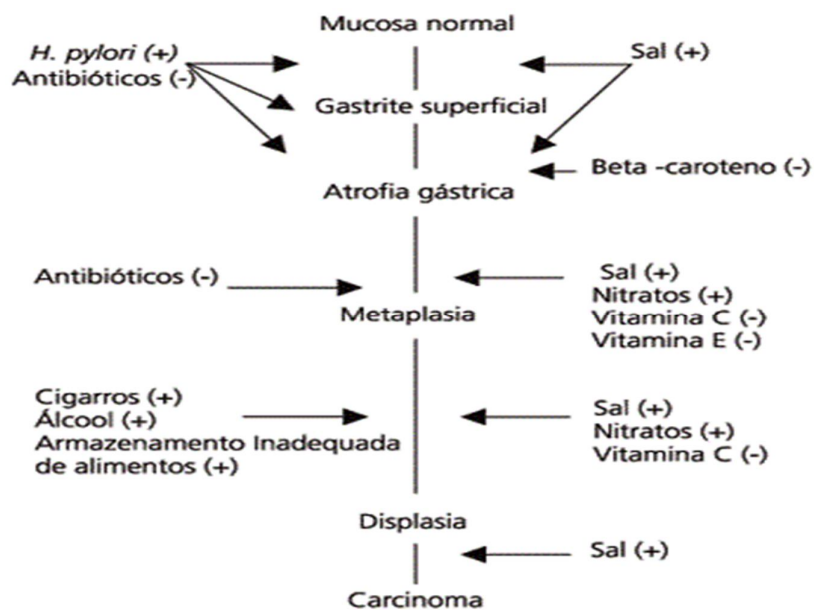
O conhecimento sobre o papel do *H. pylori* no desenvolvimento de lesões gástricas é ainda incompleto. Sabe-se que esta bactéria possui uma enzima, a urease, que permite a hidrólise da uréia gástrica em amônia e dióxido de carbono. Isto permite que o *H. pylori* mantenha um pH alcalino na superfície da mucosa gástrica. (SCOTT *et al.*, 2007). A vasta maioria destes bacilos que colonizam os hospedeiros é de vida livre, porém 20% se ligam fortemente às células epiteliais gástricas, podendo induzir mudanças ultra-estruturais nestas células. (SMITH *et al.*, 2006).

O principal evento patofisiológico da infecção pelo *H. pylori* na mucosa gástrica é a indução do processo inflamatório conhecido como gastrite, caracterizado por infiltrado de neutrófilos, células mononucleares e seus produtos. Este ambiente estimula a transcrição e síntese de diversas citocinas pró- e anti-

inflamatórias, e caso não ocorra um controle apropriado desta resposta imune pode desencadear a carcinogênese gástrica. (SUGIMOTO, *et al* 2010).

Normalmente a carcinogênese gástrica é um processo lento e pode progredir de uma lesão relativamente simples como a gastrite crônica não tratada, que se transforma em uma lesão pré-cancerosa, como a metaplasia ou displasia e finalmente carcinoma, com ou sem disseminação por metástase. (CORREA, 2004). (Figura 2).

Figura 2 – Influências ambientais no processo de carcinogênese gástrica



Fonte: Adaptado de Hwang *et al*, 1994.

A infecção pelo *H. pylori* é uma das mais comuns dentro da população, com uma prevalência mundial calculada entre 70% e 90% em países desenvolvidos (INCA, 2016), e a maioria dos indivíduos infectados 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 e em 20% das úlceras gástricas e

tem sido relacionada com o aumento do risco de câncer em até nove vezes. (KUIPERS, 1999; SCHOLTE *et al.*, 2002). Cerca de 60-80% dos casos de câncer gástrico e 90% das metaplasias intestinais têm um diagnóstico molecular positivo para *H. pylori*. (SMITH *et al.*, 2006).

Lesões *in situ* pré-neoplásicas podem ser reconhecidas como é o caso da atrofia gástrica, metaplasia e displasia (Figura 2). A atrofia gástrica ocorre em um estágio tardio da infecção pelo *H. pylori*, nela se nota uma perda significativa de estruturas glandulares, essa que já está associada à metaplasia. (CÉSAR *et al.*, 2002). Na metaplasia intestinal o epitélio assume um fenótipo das células intestinais, quadro histológico que pode ser revertido se tratado. Já os marcadores para a displasia são variações no tamanho, na forma e na orientação do epitélio junto com a textura da cromatina podendo ocorrer hipertrofia e hiper cromasia. (OHBA R, IJIMA K., 2016).

O adenocarcinoma pode ser classificado com base em aspectos histopatológicos e clínicos em dois tipos: intestinal e difuso. 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, não possuindo atrofia gástrica. É um pouco mais frequente em pacientes jovens, e são encontrados uniformemente em todo o mundo em ambos os sexos, possuindo assim alta ocorrência familiar, principalmente entre indivíduos com tipo sanguíneo A. (SHEH, A., & FOX, J. G., 2013).

2.1.2 Receptores *Toll-Like*

A resposta imune inata representa a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, esta que é desencadeada através da ativação de receptores que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), dessa maneira proporciona a indução de uma cascata pró-inflamatória com o objetivo de eliminar o agente infeccioso. Entre a crescente família desses receptores, os *Toll-like* são os mais amplamente estudados, já que várias células do sistema imune e não imune os expressam, desempenhando um papel fundamental na resposta inata e

adaptativa. Os *TLRs* possuem semelhanças estruturais, mas se diferem principalmente na especificidade de ligação a proteínas de acordo com o seu alvo (ACHEK *et al.*, 2016).

Atualmente, dez tipos de *TLRs* têm sido encontrados em humanos, entre eles o *TLR2* está envolvido na resposta a infecção pelo *H. pylori*. Assim, este receptor medeia a ativação de fatores de transcrição, principalmente via NF- κ B, resultando na inflamação. Estes receptores são proteínas de membrana tipo I e um de seus componentes inclui uma estrutura com repetição rica em leucina (RRL), que está envolvida na ligação proteica. Por meio dessa estrutura os *TLRs* reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos. Seus componentes intracelulares são associados com o domínio Toll/IL-1R, que se assemelham aos receptores da interleucina 1. (SEYA *et al.*, 2010).

Há evidências que *TLR2* é expresso em células epiteliais gástricas infectadas pelo *H. pylori*. Após transfecção com *TLR2*, células infectadas com a bactéria *H. pylori*, tiveram o fator de transcrição NF- κ B ativado e um conseqüente aumento da expressão de IL8. Estes resultados demonstraram que o *TLR2* pode ter um papel significativo na imunidade da mucosa gástrica após infecção pelo *H. pylori*. (SMITH *et al.*, 2003).

Os genes destes receptores de membrana de células de defesa 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 outras patologias, incluindo o câncer. (EL-OMAR, Ng e HOLD, 2008; LI *et al.*, 2012).

Polimorfismos no gene *TLR2* têm sido associados à suscetibilidade para várias doenças inflamatórias e infecciosas, como lepra. (SURYADEVARA *et al.*, 2013), e leishmaniose visceral (EIGHAL *et al.*, 2016), infecções bacterianas recorrentes em crianças. (KUTUKCULER *et al.*, 2007), e doenças crônicas do fígado. (KESAR e ODIN, 2013). Em adição, outros estudos recentes têm relacionado polimorfismos neste gene com câncer colorretal, cervical, gástrico e de mama. (BORASKA JELAVIC *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2009; OLIVEIRA e SILVA, 2012; LIU *et al.*, 2015; PROENÇA *et al.*, 2015; AL-HARRAS *et al.*, 2016).

O gene *TLR2* está localizado no cromossomo 4 e o polimorfismo *TLR2 del -196 para -174*, causa uma deleção de 22 nucleotídeos que alteram a atividade promotora deste gene, diminuindo os receptores com capacidade de reconhecimento bacteriano. (NOGUCHI *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2015 e AL-HARRAS *et al.*,2016).

Na população japonesa e chinesa, tal polimorfismo foi associado com maior suscetibilidade ao câncer gástrico e metaplasia intestinal. (TAHARA *et al.*, 2007; TAHARA *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2015). Um estudo recente na população brasileira demonstrou a associação da variante *TLR2 del* com o câncer gástrico mas não com gastrite crônica na população brasileira, entretanto, não se evidenciou a relação com a presença do *H. pylori*, já que uma das limitações deste estudo, estava na falta de diagnóstico da bactéria no grupo controle. (OLIVEIRA e SILVA, 2012). Assim, na população brasileira não há estudos que demonstrem a associação direta desta deleção no gene *TLR2* com a presença do *H. pylori*, assim como a correlação da variante e os níveis de expressão gênica do *TLR2*.

2.2 OBJETIVOS

Tendo-se em vista a importância biológica deste receptor e regulador da resposta imune inata e os poucos estudos da literatura envolvendo polimorfismos e expressão gênica do *TLR2* com a infecção pelo *H. pylori* e carcinogênese gástrica na população brasileira. Este estudo tem por objetivo avaliar esses polimorfismos em portadores de lesões do trato digestório e associar a uma predisposição ao câncer.

Sendo seus objetivos específicos:

- a) Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *TLR2* deleção - 196 para -174 nos grupos casos e controle;
- b) Traçar um perfil genético desses polimorfismos em associação com o risco aumentado para as lesões gástricas avaliadas; como também para a infecção pelo *H. pylori*;

- c) Avaliar a expressão gênica relativa do RNAm pela técnica de PCR em tempo real do gene *TLR2*, e possíveis associações entre os níveis de expressão gênica e as variantes polimórficas.

2.3 METODOLOGIA

Na primeira etapa do estudo, as análises polimórficas foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da Universidade do Sagrado Coração de Bauru-SP (USC). Os ensaios de expressão gênica foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular Humana, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade do Sagrado Coração de Bauru e aprovado com parecer número 896.065 (Anexo A).

2.3.1 Casuística

Este estudo dividiu-se em duas principais etapas: caracterização do polimorfismo *TLR2* deleção -196 para -174 e análise da expressão gênica *TLR2* por PCR-real time. Todas as amostras incluídas foram obtidas de pacientes com queixas gástricas e atendidos no Serviço de Gastrenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília, Hospital Estadual de Bauru, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) ou Hospital do Câncer de Barretos-SP, submetidos à endoscopia digestiva alta ou cirurgia gástrica, e com idade variando entre 1 a 80 anos e que não receberam drogas quimioterápicas, antibióticos e inibidores de bombas de prótons. Os pacientes ou responsáveis receberam e assinaram um questionário e o termo de consentimento livre esclarecido, referente ao estudo (Anexo B).

Na Tabela 1 estão descritos os números amostrais para os grupos casos de Gastrite Crônica-GC, Câncer Gástrico-CG e Controle-C. Para a análise foram avaliadas 475 amostras, sendo que o grupo caso de Câncer Gástrico (CG) está constituído por 61 adenocarcinomas do tipo intestinal de acordo com a classificação de LAUREN (1965), sendo todos positivos para *H. pylori*; o Grupo de Gastrite Crônica (GC) contem 239 amostras, sendo 92 positivas para *H. pylori* e 147

negativas para *H. pylori*, classificadas pelo Sistema de Sidney. (DIXON, GENTA; YARDLEY, 1996). O grupo Controle (C) esta formado por 175 pacientes que passaram por endoscopia, mas o exame histopatológico ou endoscópico foi negativo para qualquer doença gástrica. A segunda etapa refere-se à avaliação da expressão gênica do RNAm por PCR real time, para qual foram utilizadas amostras de RNA de 23 pacientes com Câncer Gástrico, 48 pacientes com Gastrite Crônica, e 14 pacientes Controle.

Vale ressaltar que, as amostras fornecidas foram randomizadas e blindadas na qual somente o pesquisador coordenador do presente estudo teve acesso às informações de cada paciente apenas para a avaliação dos dados, após toda a parte experimental realizada.

A descrição dos indivíduos dos grupos casos e controle quanto ao sexo, idade e presença da bactéria *H. pylori* está detalhada na Tabela 2.

Tabela 1 - Total de amostras de DNA e RNA dos grupos casos (GC e CG) e controle (C).

Grupos Amostrais		DNA (n)	RNA (n)
Gastrite Crônica – GC	<i>H. pylori</i> negativo	147	31
	<i>H. pylori</i> positivo	92	17
Controle –C	<i>H. pylori</i> negativo	175	14
Câncer Gástrico – CG	<i>H. pylori</i> positivo	61	23
Total		475	85

n=número amostral. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 2 - Descrição dos indivíduos dos grupos de câncer gástrico (CG), gastrite crônica (GC) e controle (C) segundo as variáveis: sexo e idade (anos) e *Helicobacter pylori* (positivo e negativo).

Variáveis	Câncer Gástrico (CG) N(%)	Gastrite Crônica (GC) N(%)	Controle (C) N(%)
Sexo			
Feminino	16 (26%)	132 (40,12%)	55 (67,90%)
Masculino	45 (74%)	197 (59,87%)	26 (32,09%)
Idade			
< 18 anos	-	60 (18,23%)	22 (27,16%)
≥ 18 anos	61	179 (81,76%)	94 (72,83%)
<i>H. pylori</i>			
Positivo	61	147 (44,68%)	-
Negativo	-	92 (27,96%)	175 (100%)
Total	61	239	175

Fonte: Elaborado pela autora.

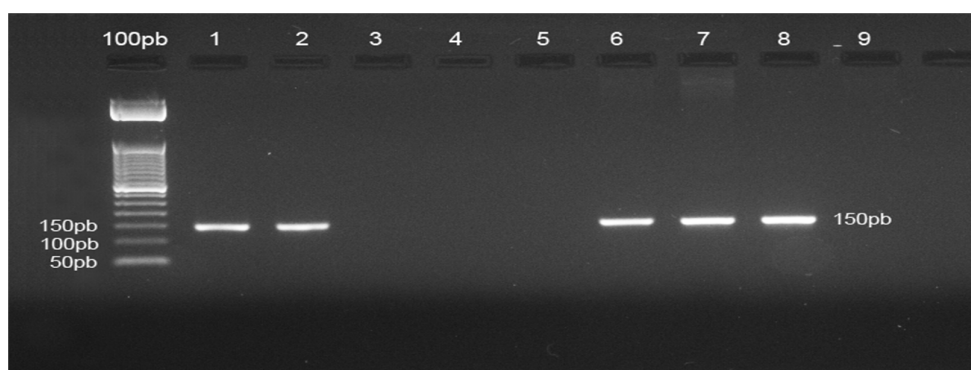
2.3.2 Estudo Molecular

A extração do DNA a partir das biópsias da região do antro do estômago foi realizada conforme protocolo estabelecido pelo Kit QiAmp da Qiagen. A extração do DNA ocorre basicamente em 3 fases, utilizando uma coluna feita de sílica apropriada para ligação do DNA. A primeira etapa consiste na lise das células e em seguida adsorção das mesmas na coluna. Em seguida são realizadas lavagens, com soluções descontaminantes, da resina contendo DNA, assim é obtido o DNA eluído. O último passo consiste na ressuspensão do DNA em 200µl de tampão AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA, pH 9.0) ou água.

Para detecção de *H. pylori* através da técnica de PCR, foi utilizado um par de primers Hpx1/Hpx2 (F: 5'-CTGGAGARACTAAGYCCTCC-3' e 5'-GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA-3') o qual amplifica um fragmento de 150pb referente ao fragmento da fração 16S do RNA bacteriano. As condições

adequadas para a reação de PCR seguiram o protocolo descrito por Scholte (SCHOLTE, *et al.*,2002), sendo os produtos analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 3).

Figura 3 - Padrão de migração eletroforética do gene *HPX* na reação de PCR, fragmento de 150pb. Colunas 1, 2, 6, 7 e 8: amostras de pacientes positivos para o gene do *HPX*; Colunas 3,4 e 5: amostras de pacientes negativos para o gene do *HPX*. Padrão molecular de 100pb.



Fonte: elaborado pela autora.

A análise do polimorfismo foi determinada por amplificação gênica empregando-se a técnica de PCR-alelo específico. Os primers utilizados e o tamanho dos fragmentos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Polimorfismo *TLR2 del* 196 para 174 e sua sequência de *primers* conforme referências da literatura.

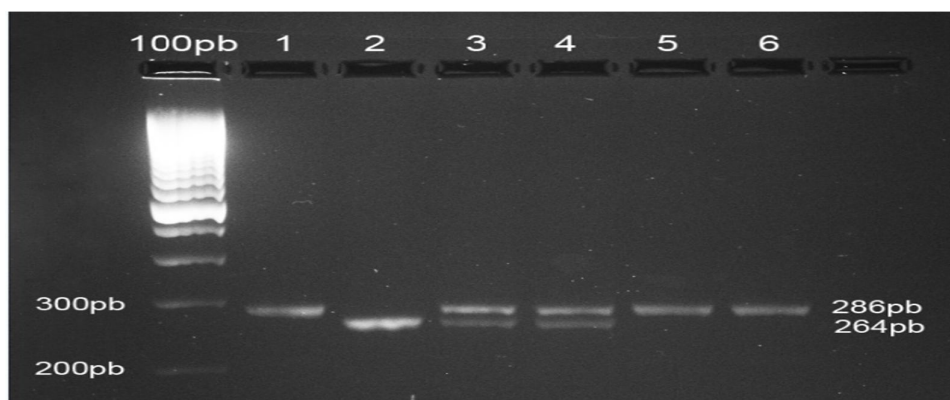
Genes	Primers (5'-3')	Fragmento
<i>TLR2 del -196</i>	F:CACGGAGGCAGCGAGAAA	ins/ins:286pb
<i>para -174</i>	R:CTGGGCCGTGCAAAGAAG	ins/del:286+264pb del/del: 264pb

Fonte: Tahara *et al.*, 2008.

Na reação de PCR (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 ciclos a 94°C por 45 segundos, a 60°C por 30 segundos, a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 3,5% (©Invitrogen) corado com brometo de etídio na presença de um marcador molecular de 100 pb, como podem ser visualizados na Figura 4.

Figura 4 - Padrão eletroforético dos fragmentos gerados pela técnica de PCR-alelo específico para o gene *TLR2* deleção -196 para 174 de 286-264 pb. Coluna 1,5,6: INS/INS. Coluna 2: DEL/DEL. Coluna 3 e 4: INS/DEL.



Fonte: elaborado pela autora.

A análise da expressão gênica foi realizada quantitativamente por PCR em tempo real. Após ajuste das concentrações, o RNA foi transcrito utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)* de acordo com o protocolo do fabricante. As reações foram realizadas em um termociclador *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* e o cDNA estocado a -20°C. A análise da expressão do gene *TLR2* foi realizada no termociclador automático (*ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System*) e a quantificação do RNA nas amostras utilizará os valores de Ct pela fórmula 2 (- $\Delta\Delta C_t$) de acordo com LIVAK et al., (2001). Os genes de referência utilizados para análise das amostras foram GUSB (hs00939627_m1) e TBP (hs0042720-m1).

Os iniciadores e sondas para a amplificação e detecção dos genes foram selecionados pelo guia de seleção de genes da *Applied Biosystems*. O iniciador

utilizado *TLR2* (hs01872448_s1) já foi testado e validado pela empresa, para determinar a eficiência de amplificação foram construídas curvas-padrão com diluições em série de amostras de cDNA (*pool* de cDNA puro e diluições: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625). As reações foram realizadas utilizando o sistema *Taqman* (Applied Biosystems).

2.3.3 Análises Estatística

Para a comparação das frequências genótípicas e alélicas entre os grupos utilizou-se o teste exato de Fisher. A associação entre o polimorfismo, os grupos histológicos analisados e a presença do *H. pylori* foram analisados 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 significativo.

Os dados de expressão gênica relativa foram apresentados como medianas para cada grupo, e foi utilizado um método de detecção de *outliers*. (MAROCO, 2007). A distribuição dos dados foi determinada pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Para analisar a influência da expressão gênica e fatores como polimorfismo e presença do *H. pylori* foi utilizado o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para as análises foram utilizadas a ferramenta estatística online SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>), o Programa GraphpadInstat 3.0 e GraphPad Prism 5 version 5.01. Nas análises $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Análise do Polimorfismo

Para o estudo do polimorfismo *TLR2* del -196 para -174 foram amplificados 475 amostras pela técnica de PCR-*polymerase chain reaction*, sendo 61 pacientes com câncer gástrico, 147 pacientes com gastrite crônica (positivos para o *Helicobacter pylori*), 92 pacientes com gastrite crônica (negativos para o *Helicobacter pylori*) e 175 pacientes com a mucosa gástrica normal.

No grupo de gastrite crônica, as frequências genótípicas para o *TLR2* deleção -196 para 174 para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL foram de 77%, 21% e 2%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para INS foi de 0,88 e para DEL de 0,12. No grupo de Câncer Gástrico as frequências genótípicas para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL foram de 74%, 21% e 5%, respectivamente, enquanto a frequência alélica para INS foi de 0,84 e para DEL de 0,16. No grupo Controle obteve-se uma frequência genotípica para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL de 73%, 26% e 1% respectivamente, já a frequência alélica foi para INS de 0,86 e para DEL de 0,14 (Tabela 4).

A comparação das frequências genótípicas entre os grupos Gastrite vs Controle, Câncer vs Controle e Gastrite vs Câncer, nos modelos codominante ($p=0,53$; $p=0,24$ e $p=0,53$, respectivamente), dominante ($p=0,35$; $p=0,87$ e $p=0,71$, respectivamente) e recessivo ($p=0,66$; $p=0,11$ e $p=0,26$, respectivamente) não evidenciou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Nas análises de frequência alélica também não demonstrou-se diferenças relevantes (Tabelas 5, 6 e 7).

Para avaliar a associação do polimorfismo *TLR2* del -196 para 174 com a presença do *H. pylori* agrupamos as amostras em um grupo controle *H. pylori* negativo formado por 267 pacientes e um grupo *H. pylori* positivo formado por 208 pacientes. As frequências genótípicas no grupo de *H. pylori* positivo para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL foram de 75%, 23% e 2% respectivamente; já para o grupo de *H. pylori* negativo temos para os mesmos genótipos as porcentagens de 74%, 22% e 4%, sem diferenças estatisticamente significativas (Tabela 8).

Tabela 4 - Frequências Genóticas e Alélicas nos grupos Controle, Câncer e Gastrite para o polimorfismo *TLR2 -196 para -174*

Genótipos	Controle N=175 (100%)	Gastrite N=239 (100%)	Câncer N=61(100%)
INS/INS	128 (73%)	185 (77%)	45 (74%)
INS/DEL	45 (26%)	50 (21%)	13 (21%)
DEL/DEL	2 (1%)	4 (2%)	3 (5%)
Alelos			
INS	301 (86%)	420 (88%)	103 (84%)
DEL	49 (14%)	58 (12%)	19 (16%)

INS/INS = Homozigoto selvagem; **INS/DEL** = Heterozigoto; **DEL/DEL** = Homozigoto polimórfico. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5 - Análise das frequências genóticas e alélicas nos modelos codominante, dominante e recessivo nos grupos Controle VS Gastrite para o polimorfismo *TLR2 -196 para -174*

Modelo <i>TLR2 del -196 para -174</i>	Genótipos/ Alelos	Controle N=175 (100%)	Gastrite N=239 (100%)	OR (95%IC)	P
Codominante	INS/INS	128 (73%)	185 (77%)	1,00	0,53
	INS/DEL	45 (26%)	50 (21%)	0,78 (0,49-1,24)	
	DEL/DEL	2 (1%)	4 (2%)	1,37 (0,25-7,61)	
Dominante	INS/INS	128 (73%)	185 (77%)	1,00	0,71
	INS/DEL+			0,81	
	DEL/DEL	46 (27%)	54 (23%)	(0,51-1,27)	
Recessivo	INS/INS+			1,00	0,26
	INS/DEL	171 (99%)	235 (98%)		
	DEL/DEL	2 (1%)	4 (2%)	1,45 (0,26-8,03)	
Frequência Alélica	INS	301 (86%)	420 (88%)	0,84	0,36
	DEL	49 (14%)	58 (12%)	(0,56-1,27)	

OR= odds ratio; **IC**= Intervalo de Confiança. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 6 - Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante e recessivo nos grupos Controle VS Câncer para o polimorfismo *TLR2 -196 para -174*.

Modelo <i>TLR2 del</i> <i>-196 para</i> <i>-174</i>	Genótipos/ Alelos	Controle N=175 (100%)	Câncer N=30 (100%)	OR (95%IC)	P
Codominante	INS/INS	128 (73%)	45 (74%)	1,00	0,24
	INS/DEL	45 (26%)	13 (21%)	0,80 (0,39-1,65)	
	DEL/DEL	2 (1%)	3 (5%)	4,32 (0,64- 29,10)	
Dominante	INS/INS	128 (73%)	45 (74%)	1,00	0,87
	INS/DEL + DEL/DEL	46 (27%)	16 (26%)	0,94 (0,48-1,87)	
Recessivo	INS/INS + INS/DEL	171 (99%)	58 (95%)	1,00	0,11
	DEL/DEL	2 (1%)	3 (5%)	4,56 (0,68 -30,46)	
Frequência Alélica	INS	301 (86%)	103(84%)	1,13 (0,63-2,01)	0,65
	DEL	49 (14%)	19 (16%)		

OR= odds ratio; **IC=** Intervalo de Confiança. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 7 - Análise das frequências genótípicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e frequência alélica nos grupos Câncer VS Gastrite para o polimorfismo *TLR2 del -196 para -174*.

Modelo <i>TLR2 del -196 para -174</i>	Genótipos/ Alelos	Câncer N=30 (100%)	Gastrite N=239 (100%)	OR (95%IC)	P
Codominante	INS/INS	45 (74%)	185 (77%)	1,00	0,53
	INS/DEL	13 (21%)	50 (21%)	1,01 (0,50-2,06)	
	DEL/DEL	3 (5%)	4 (2%)	2,54 (0,52-12,38)	
Dominante	INS/INS	45 (74%)	185 (77%)	1,00	0,71
	INS/DEL+ DEL/DEL	16 (26%)	54 (23%)	1,14 (0,59-2,21)	
Recessivo	INS/INS+ INS/DEL	58 (95%)	235 (98%)	1,00	0,26
	DEL/DEL	3 (5%)	4 (2%)	2,53 (0,52-12,25)	
Frequência Alélica	INS	103 (84%)	420 (88%)	1,33 (0,76-2,34)	0,36
	DEL	19 (16%)	58 (12%)		

OR= odds ratio; **IC=** Intervalo de Confiança. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 8 - Análise das frequências genótípicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e frequência alélica nos grupos *H. pylori* positivo vs *H. pylori* negativo para o polimorfismo *TLR2 del -196 para -174*

Modelo <i>TLR2 del -196</i> <i>para -174</i>	Genótipos/ Alelos	<i>H. pylori</i> Positivo N=208 (100%)	<i>H. pylori</i> Negativo N= 267 (100%)	OR (95%IC)	P
Codominante	INS/INS	157 (75%)	201 (74%)	1,00	0,40
	INS/DEL	47 (23%)	61 (22%)	0,99 (0,64-1,52)	
	DEL/DEL	4 (2%)	11 (4%)	0,47 (0,15-1,49)	
Dominante	INS/INS	157 (75%)	201 (74%)	1,00	0,64
	INS/DEL+ DEL/DEL	51 (25%)	72 (26%)	0,91 (0,60-1,37)	
Recessivo	INS/INS+ INS/DEL	204 (98%)	262 (96%)	1,00	0,18
	DEL/DEL	4 (2%)	11 (4%)	0,47 (0,15-1,49)	
Frequência Alélica	INS	361 (87%)	463 (85%)	0,97	1,00
	DEL	55 (13%)	83 (15%)	(0,55-1,71)	

OR= odds ratio; IC= Intervalo de Confiança. Fonte: elaborado pela autora.

2.4.1 Análise de Expressão Gênica

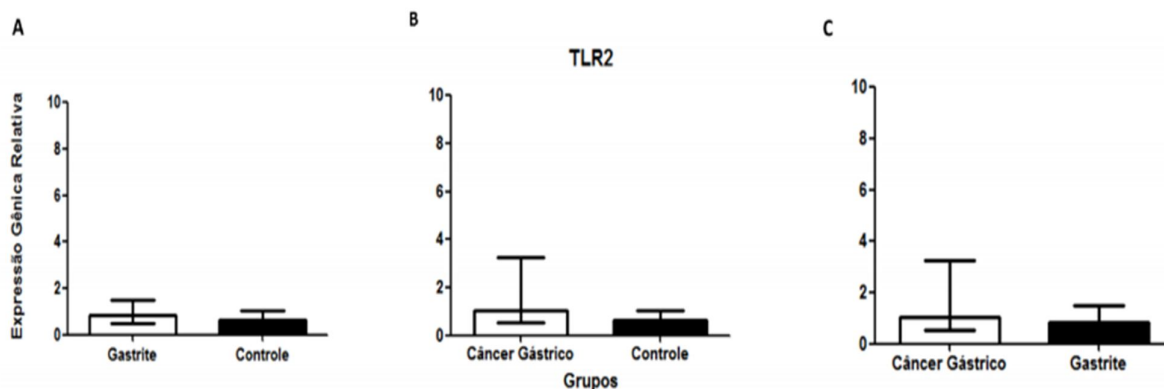
Os níveis de expressão gênica relativa para *TLR2* podem ser visualizados na Tabela 9 e Figura 3. Observou-se, entretanto, que não houve alteração nos níveis de expressão relativa para o gene *TLR2*, onde a Mediana de RQ (Quantificação Relativa) para o grupo Controle foi de 0,61, para o grupo Câncer Gástrico foi de 1,05 e para Gastrite Crônica de 0,81, não havendo diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos analisados, Controle vs Câncer ($p=0,07$), Controle vs Gastrite Crônica ($p=0,26$) e Câncer Gástrico vs Gastrite Crônica ($p=0,18$).

Tabela 9 - Níveis de expressão gênica relativa de *TLR2* para os grupos de Gastrite Crônica-GC, Câncer Gástrico-CG e Controle-C.

Variáveis	Controle - C (n=14)	Câncer Gástrico CG (n=23)	Gastrite Crônica GC (n=48)
Mediana	0,61	1,05	0,81
Intervalo (25-75 Percentil)	0,37-1,02	0,52 - 3,22	0,49 - 1,46
P		0,07	0,26
			0,18

Mann Whitney teste. Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5 - Níveis de expressão gênica relativa para o gene *TLR2*. A) Comparação de mediana de RQ dos grupos Gastrite Crônica e Controle ($p=0,26$); B) Comparação de mediana de RQ dos grupos Câncer Gástrico e Controle ($p=0,07$) e C) Comparação de mediana de RQ dos grupos Câncer Gástrico e Gastrite Crônica ($p=0,18$). Diferença estatisticamente significativa $p<0,05$. RQ=Quantificação Relativa. Tratamento de outliers.

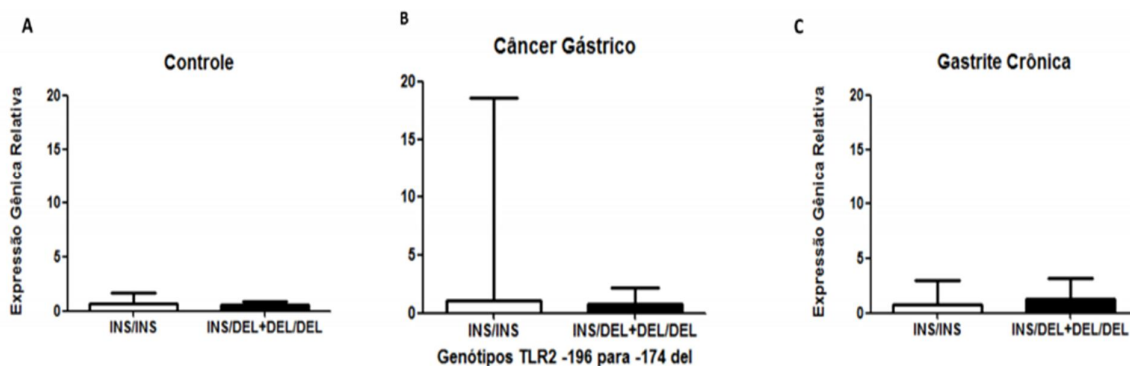


Fonte: elaborado pela autora.

Em outra análise, as amostras foram separadas de acordo com os genótipos dos polimorfismos *TLR2* -196 para -174 INS/INS e INS/DEL + DEL/DEL (Figura 4).

Para o polimorfismo *TLR2* -196 para -174 INS/DEL, no grupo Controle, indivíduos portadores dos genótipos selvagem INS/INS apresentaram mediana de RQ=0,63, enquanto os portadores da deleção INS/DEL + DEL/DEL apresentaram mediana de RQ=0,57, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos ($p=0,53$). No grupo Gastrite Crônica, indivíduos portadores dos genótipos selvagem INS/INS apresentaram mediana de RQ=0,78, enquanto os portadores da deleção INS/DEL + DEL/DEL apresentaram mediana de RQ=1,25, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipo ($p=0,14$). No grupo de Câncer Gástrico, indivíduos portadores dos genótipos selvagem INS/INS apresentaram mediana de RQ=1,08, enquanto os portadores da deleção INS/DEL + DEL/DEL apresentaram mediana de RQ=0,80, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipo ($p=0,22$).

Figura 6 - Níveis de expressão gênica relativa para o polimorfismo *TLR2*-196 para-174 *INS/DEL*, comparação entre os portadores do genótipo selvagem *INS/INS* e da associação dos portadores da deleção gênica (*INS/DEL* + *DEL/DEL*). A) Grupo Controle ($p=0,53$); B) Grupo Câncer Gástrico ($p=0,22$). C) Grupo Gastrite Crônica ($p=0,14$). Diferença estatisticamente significativa $p<0,05$. Tratamento de outliers.



Fonte: elaborado pela autora.

Para finalizar foi realizado um agrupamento com relação a ausência e presença da bactéria *H. pylori*, onde obteve-se 40 amostras no grupo *H. pylori* positivo e 45 amostras no grupo *H. pylori* negativo. Assim, para o gene *TLR2* não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (Tabela 10). No polimorfismo *TLR2* -196 para -174 *INS/DEL*, para o grupo onde os pacientes são Positivos para *Helicobacter pylori*, obteve-se mediana de RQ=0,92, enquanto os pacientes Negativos para *Helicobacter pylori* apresentaram mediana de RQ=0,92, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos ($p=0,19$).

Tabela 10 - Níveis de expressão gênica relativa para o gene *TLR2* para os grupos de *H. pylori* positivo e *H. pylori* negativo.

Variáveis	<i>H. pylori</i> positivo (N=40)	<i>H. pylori</i> negativo (N=45)
Mediana	0,92	0,92
Intervalo (25-75 Percentil)	0,56 - 3,13	0,49 - 1,51
P		0,19

Fonte: elaborado pela autora.

3 DISCUSSÃO

Polimorfismos em genes de receptores do sistema imune influenciam o perfil de resposta aos agentes infecciosos, como o *H. pylori*, podendo contribuir para variações no risco da carcinogênese gástrica. (HUSSEIN, 2010). No presente estudo a investigação de associação do polimorfismo no gene do receptor *toll like* – *TLR* (*TLR2* deleção -196 a -174) com o risco de desenvolvimento do câncer gástrico (CG) e gastrite crônica (GC) não evidenciou qualquer associação do polimorfismo *TLR2* INS/DEL com o risco aumentado para as lesões gástricas analisadas.

Uma meta-análise, muito ampla, que avaliou o risco deste polimorfismo em diversos tipos de câncer e etnias demonstrou que o alelo *TLR2* DEL está associado ao aumento do risco de câncer gástrico em populações caucasoides, mas não está associado ao aumento do risco para o câncer gástrico nas populações Asiáticas, assim como não encontraram risco para o câncer de bexiga nesta população. (ZHU *et al.*, 2013). Um estudo mais recente, também avaliou este polimorfismo em câncer cervical e não conseguiu demonstrar associação do polimorfismo *TLR2* -196 a -174 DEL entre mulheres da Tunísia. (ZIDI *et al.*, 2014).

Estudos realizados com câncer de mama também demonstraram resultados contrastantes. No Egito, 172 mulheres, sendo 72 pacientes com câncer de mama e 100 voluntárias controle foram avaliadas para a deleção no gene *TLR2*, os resultados não demonstraram associação de risco para os genótipos INS/DEL ($p=0,86$) e DEL/DEL ($p=0,79$) com relação aos homozigotos selvagens INS/INS. (AL-HARRAS *et al.*, 2016). Contudo, um estudo realizado na população Grega, que avaliou 741 mulheres, sendo 261 com câncer de mama e 480 consideradas saudáveis, constatou uma associação positiva a este polimorfismo com o risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de mama, sendo os genótipos INS/DEL (43,29%), DEL/DEL (10,72%) e o alelo DEL (32,37%) os mais frequentes encontrados nas mulheres com esse tipo de câncer ($p<0,0001$). (THEODOROPOULOS *et al.*, 2012). Isso ressalta que as discordâncias encontradas com relação ao risco associado ao alelo DEL nos mais diversos tipos de neoplasias, estão relacionadas a diferentes origens genéticas e ao número amostral de cada investigação.

Um recente estudo na população Chinesa que avaliou 303 indivíduos, demonstrou uma associação dos polimorfismos do *TLR2* -196 a -174 *del* e do *TLR3* [C. 1377C / T (rs 3775290)] com suscetibilidade para carcinogênese gástrica nesta população. Nesse estudo foram comparados os grupos Câncer Gástrico e Controle, esses que obtiveram frequências genóticas do polimorfismo no gene *TLR2* para INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL de 34,93%, 41,51% e 23,92%, respectivamente no grupo Câncer Gástrico, e no grupo Controle foram respectivamente de 44,68%, 39,36% e 15,96%. (LIU *et al.*, 2015). Uma frequência muito maior da deleção com relação ao nosso estudo, cujos genótipos INS/DEL e DEL/DEL no grupo câncer apareceram em 21% e 5%, respectivamente; e no grupo controle em 26% e 1% dos avaliados, respectivamente.

Alguns estudos têm investigado a associação da deleção *TLR2* -196 a -174 DEL no desenvolvimento de doenças relacionadas ao processo inflamatório e diversos câncer, mas com resultados conflitantes. PANDEY *et al* (2009) encontraram que o alelo *TLR2* DEL está associado com suscetibilidade para o câncer cervical. Assim como, TAHARA *et al* (2007) investigaram a influência deste polimorfismo na ocorrência de câncer gástrico não- cárdia e lesões como gastrite e úlcera duodenal e sugeriram uma associação do genótipo *TLR2* -196 a -174 DEL/DEL apenas na população japonesa. De modo contrário, WANG *et al* (2007) na população japonesa falharam em mostrar associação dos genótipos *TLR2* -196 a -174 DEL/DEL e INS/DEL em pacientes com colite ulcerativa.

Um estudo prévio na população brasileira com o polimorfismo *TLR2* -196 a -174 DEL que avaliou 607 indivíduos demonstrou uma associação de risco do genótipo *TLR2* DEL/DEL para o desenvolvimento do câncer gástrico. Entretanto, as frequências genóticas encontradas nesse estudo para os genótipos INS/INS, INS/DEL e DEL/DEL no grupo Câncer Gástrico, foram de 66,6%, 28,7% e 4,7%, respectivamente, e no Grupo Controle de 84%, 15,1 % e 0,9%, respectivamente. (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Observa-se, portanto nestes dados uma diferença na frequência da deleção (INS/DEL e DEL/DEL) com relação ao grupo controle e no grupo câncer deste estudo prévio e o nosso atual estudo na população brasileira, que demonstrou frequências no grupo controle de 73% para INS/INS, 26% para INS/DEL e 1% para DEL/DEL, e no grupo câncer frequências de 74% para INS/INS, 21% para INS/DEL e 5% para DEL/DEL.

Este resultado pode ser devido a composição do grupo controle, que no presente trabalho é composto por pacientes que passaram pela endoscopia devido a queixas gástricas ou outras indicações e fizeram o exame histopatológico descartando qualquer lesão gástrica, diferente do estudo preliminar na população brasileira onde os indivíduos controles eram doadores de sangue e não haviam dados histológicos ou endoscópicos que descartassem qualquer doença gástrica.

Com relação a alteração dos níveis de expressão do gene *TLR2*, não ficou evidenciado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de Gastrite Crônica, Câncer Gástrico e Mucosa Normal nos pacientes selecionados para este estudo, assim como também não ficou evidente a alteração de expressão gênica devido a presença da bactéria *H. pylori*. Um estudo recente, também na população brasileira investigou a expressão dos genes *TLR2* e *TLR4* em pacientes saudáveis e pacientes com câncer colorretal. Esse grupo evidenciou expressões aumentadas apenas do *TLR2* em tecidos tumorais (RQ=2,36) e quando comparado com tecido normal (RQ=1; P<0,0001), sendo assim associado com o risco aumentado para esse tipo de câncer. (Proença *et al.*, 2015). Entretanto outro estudo em tecido gástrico investigou os níveis de expressão gênica por PCR real time em pacientes com gastrite crônica e atrofia gástrica, antes e depois do tratamento para a infecção pelo *Helicobacter pylori*, e não demonstrou alteração entre os níveis de expressão do gene *TLR2* antes (RQ=1,55) e depois (RQ=1,31) do tratamento para *H. pylori* quando eles incluíram todos os pacientes em suas análises. (Cadamuro *et al.*, 2015).

Assim, muito já se discute sobre a relação de receptores do tipo *Toll Like* no reconhecimento de diversos micro-organismos e do seu importante papel na ativação da resposta imune. Entretanto, para uma conclusão definitiva torna-se importante aumentar o grupo amostral do presente estudo, que ainda é uma limitação do trabalho.

4 CONCLUSÕES

- Foram obtidas as frequências genóticas para o polimorfismo *TLR2* -196 para -174 *INS/INS*; *INS/DEL* E *DEL/DEL* nos grupos de gastrite crônica (77%, 21% e 2%, respectivamente), câncer gástrico (74%; 21% e 5%, respectivamente), e em pacientes sadios (73%, 26% e 1%, respectivamente).
- As correlações entre as amostras de Câncer Gástrico, Gastrite Crônica e Controle nos três modelos de agrupamento genotípico (codominante, dominante e recessivo) não evidenciaram diferenças estatisticamente relevantes entre esta deleção gênica e as lesões gástricas avaliadas nesta amostra populacional. Assim como não ficou demonstrada a associação entre este polimorfismo e o risco para a infecção pela bactéria *H. pylori*.
- Nas análises de expressão gênica, não houve alteração nos níveis de expressão relativa para o gene *TLR2* entre os grupos avaliados, Controle vs Câncer ($p=0,0781$), Controle vs Gastrite Crônica ($p=0,2697$), Câncer Gástrico vs Gastrite Crônica ($p=0,1876$) e *H. pylori* positivo vs *H. pylori* negativo ($p=0,1999$).

REFERÊNCIAS

ACHEK, Asma; YESUDHAS, Dhanusha; CHOI, Sangdun. **Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases**. Archives of pharmacal research, v. 39, n. 8, p. 1032-1049, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/sci-hub.cc/article/10.1007/s12272-016-0806-9>>

AL-HARRAS, Mohammad F. et al. **Polymorphisms of glutathione S-transferase π 1 and toll-like receptors 2 and 9: Association with breast cancer susceptibility**. Oncology letters, v. 11, n. 3, p. 2182-2188, 2016. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/ol/11/3/2182?text=fulltext>>

ANDERSON, K. V. **Toll signaling pathways in the innate immune response**. Curr Opin Immunol, v. 12, n. 1, p. 13-9, Feb 2000. ISSN 0952-7915. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679407>>.

ARBOUR, N. C. et al. **TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans**. Nat Genet, v. 25, n. 2, p. 187-91, Jun 2000. ISSN 1061-4036. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835634>>.

BAUER, S. et al. **Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition**. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 98, n. 16, p. 9237-42, Jul 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470918>>.

BECKERT, S. et al. **Pathogenesis of Helicobacter pylori infection**. ISI Journal Citation Reports (Gastroenterology & Hepatology); ISSN: 1523-5378 (2016).

BORASKA JELAVIC, T. et al. **Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer**. Clin Genet, v. 70, n. 2, p. 156-60, Aug 2006. ISSN 0009-9163. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879199>>

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, v. 8, n. 4, p. e60327, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565226>> .

CÉSAR, Ana Cristina Gobbo; SILVA, Ana Elizabete; TAJARA, Eloiza Helena. **Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica.** Arquivos de Gastroenterologia, p. 253-259, 2002. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/27390/S0004-28032002000400009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

CORREA, P. **The biological model of gastric carcinogenesis.** IARC Sci Publ, n. 157, p. 301-10, 2004. ISSN 0300-5038. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055303>>.

CHELI, R.; PERASSO, A.; GIACOSA, A. **Dyspepsia and chronic gastritis.** Hepato-gastroenterology, v. 30, n. 1, p. 21-23, 1983.

DIXON, Michael F. et al. **Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system.** The American journal of surgical pathology, v. 20, n. 10, p. 1161-1181, 1996.

EL-OMAR, E. M.; Ng, M. T.; Hold, G. L. **Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer.** Oncogene, v. 27, n. 2, p. 244-52, Jan 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18176606> >.

GENTA, R. M. et al. **Histochemical analysis of mucous cells of congenital adenomatoid malformation of the lung: insights into the carcinogenesis of pulmonary adenocarcinoma expressing gastric mucins.** American journal of clinical pathology, 110(4), 450-455. 1998

HWANG, H, Dwyer J, Russell M. **Diet, *Helicobacter pylori* infection, food preservation and gastric cancer risk: are there new roles for preventive factors?** Nutr Rev. 1994; 52(3):75-83. Disponível em: < <http://nutritionreviews.oxfordjournals.org.sci-hub.cc/content/52/3/75.full-text.pdf>>

HUSSEIN, N. R. **Helicobacter pylori and gastric cancer in the Middle East: a new enigma?** World J Gastroenterol, v. 16, n. 26, p. 3226-34, Jul 2010. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20614477>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2016. Disponível em < <http://www.inca.org.br>> Acesso em: 10 de Agosto de 2016.

ISRAEL, Dawn A.; PEEK JR, Richard M. **The role of persistence in *Helicobacter pylori* pathogenesis**. *Current opinion in gastroenterology*, v. 22, n. 1, p. 3-7, 2006.

KAUPPILA, J. H. et al. **Short DNA sequences and bacterial DNA induce esophageal, gastric, and colorectal cancer cell invasion**. *APMIS*, Oct 2012. ISSN 1600-0463. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082743>>.

KESAR, V.; Odin, J. A. **Toll-like receptors and liver disease**. *Liver Int*, Sep 2013. ISSN 1478-3231. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24118797>>.

KIENESBERGERS, Cox LM, Livanos A, et al. **Gastric *Helicobacter pylori* infection affects local and distant microbial populations and host responses**. *Cell Rep*. 2016;14:1395–1407. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S2211124716000383>>

KONTUREK, P. C.; Konturek, S. J.; Brzozowski, T. ***Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis**. *J Physiol Pharmacol*, v. 60, n. 3, p. 3-21, Sep 2009. ISSN 1899-1505. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826177>>.

KUIPERS, E. J. **Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer**. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 13 Suppl 1, p. 3-11, Mar 1999. ISSN 0269-2813. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209681>>.

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

KUTUKCULER, N. et al. **Arg753G In polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections**. *Biochem Genet*, v. 45, n. 7-8, p. 507-14, Aug 2007. ISSN 0006-2928. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554618>>.

LI, Q. et al. **MicroRNA-574-5p was pivotal for TLR9 signaling enhanced tumor progression via down-regulating checkpoint suppressor 1 in human lung cancer**. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e48278, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133627>>.

LIU, Shuzhen et al. **Toll-like Receptor Gene Polymorphisms and Susceptibility to Epstein-Barr Virus-associated and-Negative Gastric Carcinoma in Northern China.** Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association, v. 21, n. 2, p. 95, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392582/>>

LAUREN, Pekka. **The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification.** Acta Pathol. Microbiol. Scand., v. 64, p. 31-49, 1965.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method.** Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S1046202301912629>>

Maroco J: Análise Estatística de dados com utilização do SPSS. Lisboa-Portugal; 2007.

MUZIO, M.; Mantovani, A. **Toll-like receptors.** Microbes Infect, v. 2, n. 3, p. 251-5, Mar 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758401>>.

NOGUCHI, E. et al. **An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population.** Clin Exp Allergy, v. 34, n. 2, p. 177-83, Feb 2004. ISSN 0954-7894. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987294>>.

OLIVEIRA, J. G. et al. **Profiles of gene polymorphisms in cytokines and Toll-like receptors with higher risk for gastric cancer.** Dig Dis Sci, v. 58, n. 4, p. 978-88, Apr 2013. ISSN 1573-2568. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086128>>.

OLIVEIRA, J. G.; Silva, A. E. **Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population.** World J Gastroenterol, v. 18, n. 11, p. 1235-42, Mar 2012. ISSN 1007-9327. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468087>>.

OHBA R, Iijima K. **Pathogenesis and risk factors for gastric cancer after *Helicobacter pylori* eradication.** World Journal of Gastrointestinal Oncology.

2016; 8(9):663-672. doi:10.4251/wjgo.v8.i9.663. disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027021/>>

PANDEY, S. et al. **Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women.** *Gynecol Oncol*, v. 114, n. 3, p. 501-5, Sep 2009. ISSN 1095-6859. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541348>>.

PROENÇA MA, Oliveira JGD, Cadamuro ACT, Succi M, Netinho JG, Goloni-Bertolo EM, Pavarino &C, Silva AE. **TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer.** *World J Gastroenterol* 2015; 21(25): 7730-7741. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4491960/>>

RICHMAN, Danielle M. et al. **Beyond gastric adenocarcinoma: Multimodality assessment of common and uncommon gastric neoplasms.** *Abdominal Radiology*, p. 1-17, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/sci-hub.cc/article/10.1007/s00261-016-0901-x>>

SCHOLTE, G. H. A. et al. **Genotyping of helicobacter pylori in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: Relation to histological parameters and effects on therapy.** *American Journal of Gastroenterology*, v. 97, n. 7, p. 1687-1695, Jul 2002. ISSN 0002-9270. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000176820200017 >.

SEYA et al. **A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 26, p. 20128-20136, 2010.

SCOTT, D. R. et al. **Gene expression in vivo shows that Helicobacter pylori colonizes an acidic niche on the gastric surface.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 17, p.7235-40, Apr 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438279> >.

SHIOTA, S.; Suzuki, R.; Yamaoka, Y. **The significance of virulence factors in Helicobacter pylori.** *J Dig Dis*, Mar 2013. ISSN 1751-2980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452293> >.

SHEH, Alexander; FOX, James G. **The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis.** *Gut microbes*, v. 4, n. 6, p. 505-531, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmic.26205>>.

SMITH, M. F. 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.** *J Biol Chem*, v. 278, n. 35, p. 32552-60, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807870>>.

SMITH, M. G. et al. **Cellular and molecular aspects of gastric cancer.** *World J Gastroenterol*, v. 12, n. 19, p. 2979-90, May 2006. ISSN 1007-9327. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16718776>>.

SMITH, Sinéad M. **“Role of Toll-like Receptors in *Helicobacter Pylori* Infection and Immunity.”** *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 5.3 (2014): 133–146. *PMC*. Web. 26 Oct. 2016.

SOARES, B. A. **Seleção, caracterização e clonagem dos genes fljB e groEI agonistas do receptores de reconhecimento de padrão do sistema imune das aves.** 2013. 72 (Mestre). Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

SUGIMOTO, M.; Yamaoka, Y.; Furuta, T. **Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer.** *World J Gastroenterol*, v. 16, n. 10, p. 1188-200, Mar 2010. ISSN 1007-9327. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20222161>>.

SURYADEVARA, Naveen Chandra et al. **Influence of Intron II microsatellite polymorphism in human toll-like receptor 2 gene in leprosy.** *Human immunology*, v. 74, n. 8, p. 1034-1040, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0198885913000955>>

SUZUKI, N. et al. **Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4.** *Nature*, v. 416, n. 6882, p. 750-6, Apr 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923871>>.

TAHARA, T. et al. **Toll-like receptor 2 -196 to 174 del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer.** *Cancer Sci*, v. 98, n. 11, p. 1790-4, Nov 2007. ISSN 1349-7006. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-8-136>>

TAHARA, T. et al. **Toll-like receptor 2 (TLR) -196 to 174del polymorphism in gastro-duodenal diseases in Japanese population.** *Dig Dis Sci*, v. 53, n. 4, p. 919-24, Apr 2008. ISSN 0163-2116. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934843> >.

TAKAISHI, S.; Okumura, T.; Wang, T. C. **Gastric cancer stem cells.** *J Clin Oncol*, v.26, n. 17, p. 2876-82, Jun 2008. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539967> >.

THEODOROPOULOS GE, Saridakis V, Karantanos T, Michalopoulos NV, Zagouri F, Kontogianni P, Lymperi M, Gazouli M and Zografos GC: **Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development.** *Breast*. 534-538, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0960977612000732>>

WANG, F. et al. **Genetic polymorphisms of CD14 and Toll-like receptor-2 (TLR2) in patients with ulcerative colitis.** *J Gastroenterol Hepatol*, v. 22, n. 6, p. 925-9, Jun 2007. ISSN 0815-9319. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565650> >.

WANG L, Zhou J, Xin Y, et al. **Bacterial overgrowth and diversification of microbiota in gastric cancer.** *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016;28:261–266. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4739309/>>

WU, W. K. et al. **Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer.** *Cancer Lett*, v. 295, n. 2, p. 144-53, Sep 2010. ISSN 1872-7980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488613> >.

ZABALETA, J. **Multifactorial etiology of gastric cancer.** *Methods Mol Biol*, v. 863, p.411-35, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22359309> >.

ZHANG, J. et al. **Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis.** J Hum Genet, v. 53, n. 6, p. 479-89, 2008. ISSN 1434-5161. Disponível em: <[://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350251](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350251) >.

ZHANG, Y. et al. **Gastric parietal cell antibodies, Helicobacter pylori infection, and chronic atrophic gastritis: Evidence from a large population-based study in Germany.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, Mar 2013. ISSN 1538-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456556> >.

ZHU, L. et al. **Association of TLR2 and TLR4 polymorphisms with risk of cancer: a meta-analysis.** PLoS One, v. 8, n. 12, p. e82858, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24376595> >.

ZIDI et al. **Association of IL10-1082 and INF- γ +874 Polymorphisms with Cervical Cancer among Tunisian Women.** ISRN Genetics. Disponível em: <WWW.dx.doi.org/10.1155/2014/706516>

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

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A deleção gênica TLR2 -196 para -174 e suas Implicações na Infecção pelo *Helicobacter pylori*, na carcinogênese gástrica e avaliação da expressão gênica

Pesquisador: Juliana Garcia de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39100214.3.0000.5502

Instituição Proponente: Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 896.065

Data da Relatoria: 01/12/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto bem apresentado, com todos os itens necessários a sua avaliação por este comitê.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o polimorfismo de receptores toll like em portadores de lesões do trato digestório e associar a uma predisposição ao câncer

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, serão utilizadas biópsias e prontuários dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante e muito bem delimitada. Serão analisadas 200 biópsias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos estão apresentados de forma correta.

Recomendações:

ndn

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Bairro: Rua Imã Arminde Nº 10-50

CEP: 17.011-160

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)2107-7260

E-mail: prppg@usc.br

ANEXO B – QUESTIONÁRIO E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Questionário dos projetos: “Polimorfismos gênicos de receptores *toll like* (TLR) envolvidos no processo inflamatório do *Helicobacter pylori* e carcinogênese gástrica e avaliação de alterações na expressão gênica”

Responsáveis: Prof^a. Dr^a. Juliana Garcia de Oliveira

IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....Prontuário:.....

Data de nascimento:...../...../..... Sexo: () F () M

Grupo étnico: () caucasóide () negróide () asiático

Endereço:.....Fone:.....

Cidade:.....Estado:.....

Profissão atual:.....tempo de atuação:.....

Profissão anterior:.....tempo de atuação:.....

I. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de bebida alcoólica: () sim () não () ex-etilista

Há quantos anos:.....Tipo de bebida:.....dose/dia:.....

- Consumo de cigarro:() sim () não () ex-fumante

Há quanto anos:.....Quantidade (un/dia):.....

- Doenças anteriores:

() úlcera () gastrite () câncer (tipo:.....)

() outras (tipo:.....)

- Tratamentos anteriores: () sim () não (tipo:.....)

- Cirurgias anteriores: () sim () não (tipo:.....)

- Uso de medicamentos: () sim () não (tipo:.....)

História de câncer ou outras doenças na família (grau de parentesco)

(tipo:.....)

III- DIAGNÓSTICO PATOLÓGICO

- () gastrite () leve () moderada () severa
 () câncer gástrico: () intestinal () difuso
 () *Helicobacter pylori*: () positivo () negativo

Data:...../...../..... Responsável pelo procedimento:.....

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 Biologia Molecular e Citogenética Humana da Universidade 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 participante consente em participar do projeto de pesquisa em questão.

Bauru, _____ de _____ de 2014.

Usuário/ responsável legal

Pesquisador responsável

Projetos: “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”

Pesquisadores: Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen
Prof^a. Dr^a. Juliana Garcia de Oliveira

Instituição: USC - Universidade Sagrado Coração

Endereço: Rua Irmã Arminda, 10-50, Jardim Brasil, Bauru – SP. CEP 17011-160

Telefone: (14) 2107-7000

E-mail: juliana.oliveira@usc.br, lucas.rasmussen@usc.br