

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**MANOELA DIAS SUSI**

**POLIMORFISMO DO GENE *TLR9*-1486T/C E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM O *HELICOBACTER PYLORI*, O  
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO E AVALIAÇÃO DA  
EXPRESSÃO GÊNICA**

BAURU  
2016

**MANOELA DIAS SUSI**

**POLIMORFISMO DO *GENE TLR9-1486T/C* E SUA  
ASSOCIAÇÃO COM O *HELICOBACTER PYLORI*, O  
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO 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

Susi, Manoela Dias

S9654p

Polimorfismo do gene TLR9-1486T/C e sua associação com o *Helicobacter pylori*, o adenocarcinoma gástrico e avaliação da expressão gênica / Manoela Dias Susi. -- 2016.

54f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Garcia de Oliveira.

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

1. Polimorfismo. 2. Câncer Gástrico. 3. *Helicobacter Pylori*. I. Oliveira, Juliana Garcia de. II. Título.

**MANOELA DIAS SUSI**

**POLIMORFISMO DO *GENE TLR9-1486T/C* E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
O *HELICOBACTER PYLORI*, O ADENOCARCINOMA GÁSTRICO 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.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen  
Universidade do Sagrado Coração

---

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

Bauru, 30 de novembro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus familiares, em especial ao meu avô e meus pais.

## **AGRADECIMENTO**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me dar saúde, principalmente e me dar as forças necessárias para que eu concluísse minha graduação, e realizasse o sonho de ser formada.

Agradecer aos meu pai Leonardo Susi, que mesmo longe se fez tão presente e me apoiou em todas minhas decisões e principalmente fez meu grande sonho se tornar realidade. A minha mãe, Gláucia Dias, que mesmo não estando presente de corpo, esteve presente de espírito me ajudando a ir para frente sem ter medo.

Um agradecimento mais que especial ao meu avô Osni Dias, que em qualquer situação me mostrou o melhor caminho a ser seguido e me apoiou em todas minhas decisões, sempre me dizendo que o grande sonho da vida dele era me ver formada.

Agradecer a minha orientadora Prof. Dra. Juliana Garcia de Oliveira pela orientação, dedicação, por sempre acrescentar em meus conhecimentos e principalmente por ter dado a oportunidade da Iniciação científica. Ao Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen por aceitar a compor minha banca e também por estar sempre presente e ser prestativo seja a hora que for.

Agradecer Wilson Orcini pela paciência e dedicação ao ensinar todas as técnicas e boas práticas no laboratório de Biologia Molecular da USC.

Aos meus queridos professores que contribuíram para minha formação, realizando meu sonho, e a Universidade do Sagrado Coração por estimular a força de vontade dos alunos.

Aos meus amigos em geral que me disseram palavras de carinho para meu conforto, pelos momentos de alegrias e diversão e principalmente em especial a minha amiga Rafaela Rodrigues Montuenga por estar presente em minha vida desde sempre, a minha amiga Franciele Ierick Luchetta e Beatriz Saggin por terem vivido intensamente comigo esses anos de faculdade. Também a minha prima Maria Luiza Gonçalves Mariano que me ajudou psicologicamente e esteve comigo sempre, me apoiando.

Gostaria de finalizar agradecendo minha família por estar sempre ao meu lado, apoiando e contribuindo direta ou indiretamente para minha formação.

À todos, meu muito obrigada!

“Aos outros eu dou o direito de ser como são,  
a mim, dou o dever de ser cada dia melhor”  
(XAVIER, CHICO).

## RESUMO

A carcinogênese do estômago pode progredir de uma inflamação crônica da mucosa gástrica, resultante da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* que ativa a resposta inflamatória do hospedeiro. Assim, tem-se avaliado a associação de polimorfismos gênicos de fatores envolvidos no processo inflamatório, como os receptores do tipo *toll like* (TLR), implicados no processo carcinogênico. O presente estudo foi dividido em caracterização do polimorfismo do gene *TLR9 -1486T/C*- rs187084 e posterior análise da expressão gênica do receptor. Os polimorfismos foram genotipados em um total de 503 pacientes (Câncer Gástrico-CG= 58 pacientes; Gastrite Crônica-GC= 279 pacientes e Controle-C= 166 pacientes) por PCR-RFLP. A comparação entre os grupos GC vs C evidenciou uma associação protetora, onde os genótipos CC e TC + CC foram associadas a diminuição de risco para desenvolvimento de gastrite crônica nos modelos codominante ( $p=0,0000$ ), dominante ( $p=0,0000$ ) e recessivo ( $p=0,0074$ ), assim como a frequência alélica ( $p<0,0001$ ). A comparação entre CG vs C também demonstrou uma diferença significativa nos modelos codominante ( $p=0,0048$ ) e dominante ( $p=0,0103$ ), e na frequência alélica observou-se  $p=0,0036$  mostrando a predominância do alelo C no grupo controle. Na análise de expressão gênica, foram avaliadas 85 amostras (C=14; CG=23 e GC=48). Para o gene *TLR9* houve um aumento de expressão significativo no grupo CG em relação ao C ( $p=0,0002$ ) e com relação ao grupo GC ( $p=0,0001$ ). Na tentativa de demonstrar a associação do polimorfismo e alteração nos níveis de expressão gênica, os grupos foram reagrupados de acordo com a presença dos genótipos homocigoto selvagem e heterocigoto+homocigoto polimórfico. Nesta análise, para o polimorfismo *TLR9-1486 TC*, no grupo Controle, indivíduos portadores dos genótipos TT apresentaram um aumento nos níveis de expressão gênica relativa em comparação a mediana dos indivíduos portadores do alelo polimórfico TC+CC, diferença que foi estatisticamente significativa ( $p=0,0240$ ). Estes dados sugerem uma influência do SNP no desenvolvimento das lesões gástricas.

**Palavras chaves:** Polimorfismo. Câncer gástrico. *Helicobacter pylori*.



## ABSTRACT

Stomach carcinogenesis can be the result of a chronic inflammation of the gastric lining, caused by infection with the *Helicobacter pylori* bacteria, which triggers the host's inflammatory response. Therefore, the association of genetic polymorphisms of factors involved in the inflammatory process have been evaluated, such as the toll-like receptors, which are involved in the carcinogenic process. This study was divided into characterization of *TLR9-1486T/C*-rs187084 gene polymorphism and subsequent analysis of TLR9 receptor gene expression using real-time PCR. Polymorphisms were genotyped from 503 patients (gastric cancer: 58 patients; chronic gastritis: 279 patients; and control group: 166 patients) using PCR-RFLP. The comparison between the Chronic Gastritis group and the Control group demonstrated a protective association, in which the CC and TC + CC genotypes were associated with a decrease in the risk of chronic gastritis development in the co-dominant ( $p=0.0000$ ), dominant ( $p=0.000$ ), and recessive ( $p=0.0074$ ) models, as well as in the allele frequency ( $p<0.0001$ ). In the comparison between the Gastric Cancer group and the Control group, it was also observed a significant difference in the co-dominant ( $p=0.0048$ ) and dominant ( $p=0.0103$ ) models; whereas in the allele frequency,  $p=0.0036$  was observed, which showed the predominance of allele C in the Control group. However, the association between risks and the bacteria presence was not demonstrated. In the analysis of gene expression, 85 samples (Control=14; Gastric Cancer=23, and Chronic Gastritis=48) were evaluated. There was a significant increase in expression of the *TLR9* gene in the Gastric Cancer group over the Control group ( $p=0.0002$ ), and over the Chronic Gastritis group ( $p=0.0001$ ). In an attempt to demonstrate the association between the polymorphism and the alteration in gene expression levels, the groups were regrouped according to the presence of the homozygous wild-type genotype and the heterozygous+homozygous polymorphic genotype. In this analysis, as for the *TLR9-1486 T/C* polymorphism in the Control group, subjects with the TT genotype showed an increase in the levels of relative gene expression compared to the median of subjects with the TC+CC polymorphic allele, a difference that was statistically significant ( $p=0.0240$ ). In the other groups, there was no statistically significant difference. This data suggests an influence of SNP on the development of gastric lesions.

**Keywords:** Polimorphism. Gastric Cancer. *Helicobacter pylori*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de diferentes cânceres no Brasil.....	13
Figura 2. Anatomia do estômago.....	17
Figura 3. Microscopia eletrônica da bactéria <i>Helicobacter pylori</i> mostrando sua estrutura bacilar.....	20
Figura 4. Padrão de migração eletroforético reação de PCR para HPX.....	27
Figura 5. Padrão eletroforético pela técnica de PCR-RFLP para TLR9-1486T/C.....	28
Figura 6. Expressão gênica para o gene TLR9 entre grupos estudados.....	37
Figura 7. Expressão gênica para gene TLR9 comparando genótipos estudados.....	38
Figura 8. Expressão gênica nos grupos H. pylori positivo e negativ.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número amostral dos grupos de Gastrite Crônica, Câncer Gástrico e Controle para o polimorfismo TLR9 -1486T/C. ....	26
Tabela 2. Polimorfismo e suas sequencias de primers e enzimas utilizadas, conforme referências da literatura. ....	28
Tabela 3. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e overdominante nos grupos Controle vs Gastrite Crônica para o SNP TLR9- 1486 T/C, dados ajustados para os fatores de risco sexo e <i>H.pylori</i> . ....	33
Tabela 4. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e overdominante nos grupos Controle vs Câncer Gástrico para o SNP TLR9- 1486 T/C, dados ajustados para os fatores de risco sexo e <i>H.pylori</i> . ....	34
Tabela 5. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e overdominante nos grupos Gastrite vs Câncer para o <i>SNP TLR9 1486 T/C</i> dados ajustados para os fatores de risco sexo e <i>H.pylori</i> . ....	35
Tabela 6. Níveis de expressão gênica relativa de TLR9 para os grupos de Gastrite Crônica-GC, Câncer Gástrico-CG e Controle-C.....	36
Tabela 7. Níveis de expressão gênica relativa do <i>gene TLR9</i> para os grupos de <i>H. pylori</i> positivo e negativo. ....	39

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>17</b>
2.1	REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1.1	Anatomia do estômago e carcinogênese gástrica .....	17
2.1.2	<i>Helicobacter pylori</i> .....	19
2.1.3	Receptores Toll like.....	21
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>24</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	24
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	COLETA DAS AMOSTRAS DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS .....	25
4.2	CAUSUÍSTICA.....	25
4.3	ESTUDO MOLECULAR.....	26
4.3.1	Extração de DNA e Detecção molecular da <i>Helicobacter pylori</i> .....	26
4.3.2	Análise do polimorfismo TLR9 -1486T/C (rs187084).....	27
4.3.3	Análise da Expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRTPCR) do gene TLR9.....	29
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
5.1	DETECÇÃO DO POLIMORFISMO DO <i>TLR9 -1486 T/C - RS187084</i> .....	31
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	36
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>54</b>
	<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, para o ano de 2016 estimou-se mais de 20 mil novos casos de câncer do estômago, sendo a maioria dos afetados de homens com idade superior a 70 anos. Ainda de acordo com o Instituto Nacional do Câncer-INCA, a mortalidade para este tipo de patologia foi superior a 14 mil no país no último ano (Figura 1) (INCA, 2016). De todos os tipos de câncer, o carcinoma gástrico ocupa o segundo lugar em incidência e o terceiro lugar em mortalidade no mundo, onde é amplamente aceito que o principal fator de risco é a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (LIU et al., 2015).

Figura 1. Incidência de diferentes cânceres no Brasil

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA, 2016.

O câncer gástrico pode ser dividido em três diferentes formas histológicas, sendo elas: o adenocarcinoma, o qual representa 95% dos tumores; o linfoma com apenas 3% dos casos e o leiomiossarcoma, este que acomete músculos e ossos e são os menos frequentes (INCA, 2016).

O mais comum dos tumores malignos gástricos, o adenocarcinoma, é 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, 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, 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, 2004; FOX, WANG, 2007; INCA, 2016).

A carcinogênese gástrica apresenta etiologia complexa, na qual fatores genéticos e ambientais estão envolvidos, com diferentes fatores: como a presença de vírus e bactérias e

hábitos de vida não saudáveis. De acordo com esses hábitos enquadra-se o elevado consumo de sal e álcool, fumo, histórico de lesões e cirurgias gástricas e a infecção pelo *Helicobacter pylori*. (CORREA, 2004; KONTUREK, KONTUREK E BRZOZOWSKI, 2009; ZABALETA, 2012).

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa de formato bacilar, que desde 1994 é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um agente carcinogênico do Tipo I, e que habita a mucosa gástrica de mais de 70% da população humana com prevalência maior em países desenvolvidos, sendo adquirida na infância e que coloniza o estômago durante quase toda a vida do hospedeiro (WEN E MOSS, 2009).

Esta bactéria, por sua vez, está presente em alimentos e água potável e estima-se que continua sendo o maior fator de risco para o surgimento do câncer gástrico, já que o *H. pylori* encontra-se envolvida com o processo inflamatório da mucosa do estômago (ISRAEL E PEEK, 2006).

Comprova-se que o principal evento patofisiológico da infecção pelo *H. pylori* na mucosa gástrica é o ato de induzir o processo inflamatório, conhecido como gastrite, que se caracteriza pela infiltração de fagócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos (BAE et al., 2014). Este ambiente estimula a transcrição e síntese de diversas citocinas pró e anti-inflamatórias, e caso não ocorra um controle apropriado para esta resposta imune, pode-se desencadear a carcinogênese gástrica (SUGIMOTO, YAMAOKA E FURUTA, 2010).

Esta bactéria é o principal agente etiológico em 95% dos casos de gastrite crônica e em 20% dos casos de úlceras gástricas, onde tem sido diretamente relacionada com o aumento do risco de câncer em até nove vezes (KUIPERS, 1999; SCHOLTE et al., 2002). No Brasil, a infecção pela *H. pylori* tem sido relatada entre adultos e crianças, em uma taxa de 80% (MULLER et al., 2007).

Assim muitos pesquisadores têm focado seus estudos na patogênese do *H. pylori* na tentativa de diagnósticos mais precoces, já que o câncer gástrico quando diagnosticado em um estado avançado apresenta difícil tratamento (TAKAISHI, OKUMURA E WANG, 2008; ZHANG et al., 2013).

É também conhecido, que fatores genéticos do hospedeiro podem aumentar o risco para as lesões gástricas pré-malignas e câncer gástrico (PELETEIRO et al., 2010), portanto, pode-se estabelecer uma relação entre doenças gástricas e os polimorfismos de uma variedade de genes humanos, podendo modificar os efeitos decorrentes da exposição natural ao

ambiente, diminuindo ou aumentando a suscetibilidade dos indivíduos a tumorigênese (KUTIKHIN, 2011).

Os receptores Toll-like (TLR) são proteínas transmembranares que possuem um predomínio de repetições ricas em leucinas (SMITH, 2014) e são importantes reguladores da imunidade inata que podem ser ativados no momento do reconhecimento de ligantes bacterianos e virais, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's). A imunidade inata fornece a primeira linha de defesa do hospedeiro contra algumas infecções, assim como pelo *H. pylori*. Porém, esta resposta do organismo em alguns indivíduos não se torna eficiente, fazendo com que a bactéria fuja da resposta imune do hospedeiro e persista no estômago levando a gastrite atrófica, e por fim o câncer gástrico (ADEREM E ULEVITCH, 2000).

Como discutido o *H. pylori* é o mais importante fator de risco adquirido para câncer gástrico e sua interação com a resposta imune inata e os receptores *toll-like* é a chave para a evolução clínica desta doença. (SMITH, 2014). É inicialmente reconhecida pelos TLRs, entretanto, é possível que os polimorfismos presentes em genes destes receptores podem afetar a magnitude e direção da resposta do hospedeiro contra a infecção (CASTAÑO-RODRÍGUEZ et al., 2013).

Existem dez genes de TLRs em seres humanos, que estão presente na superfície celular (SMITH, 2014), um deles é o TLR9 que está presente em células epiteliais gástricas e irá auxiliar no reconhecimento do *H. pylori*, sendo responsável pela resposta inicial através da ligação de oligonucleotídeos CpGs, presentes apenas em DNA bacteriano (HOLD et al., 2009). Um estudo recente demonstrou que há expressão aumentada dos receptores TLR9 em células tumorais gástricas (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2014).

Alguns polimorfismos existentes no TLR9 tem sido bem estudados, entre eles os *TLR9* -1486T/C (rs187084), -1237T/C (rs5743836) e +2848G/A (rs352140) que foram associados com doenças inflamatórias e autoimunes (CARVALHO et al., 2011; KALINDERI et al., 2013), sendo raros os estudos com tumores (MANDAL, GEORGE E MITTAL, 2012; DAI et al., 2014; FEHRI et al., 2014). Entre os raros estudos com câncer gástrico do polimorfismo *TLR9* - 1486 C/T, podemos citar um artigo na população chinesa que não encontrou associação deste polimorfismo e neoplasia gástrica (ZENG et al., 2011). Entretanto, recentemente um estudo na população Chinesa demonstrou associação do alelo *TLR9* -1486 C

com o aumento do risco para o carcinoma gástrico, como também com um prognóstico ruim para a doença (WANG et al., 2013).

Estes resultados demonstram a grande inconsistência dos trabalhos encontrados na literatura e a importância de avaliar este polimorfismo TLR9 -1486 C/T em pacientes com problemas gástricos e sua associação com a infecção pelo *Helicobacter pylori* na população brasileira.



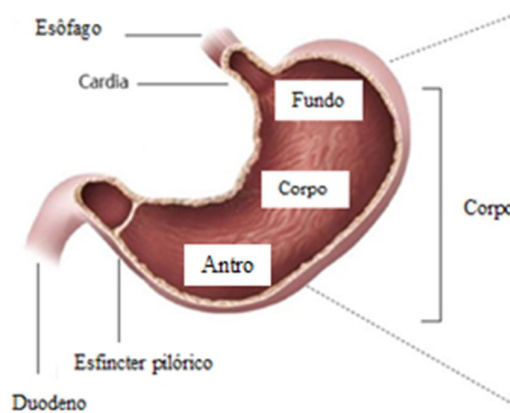
## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1.1 Anatomia do estômago e carcinogênese gástrica

O trato gastrointestinal (TGI) é formado por duas partes: (1) órgãos situados ao longo de um tubo oco que se estendem da boca até o ânus e (2) órgãos glandulares anexados que liberam seu conteúdo na luz do trato. A principal função do TGI é absorver nutrientes e água que passam para a circulação sanguínea, além de eliminar produtos residuais. O estômago é o principal órgão do TGI, podendo ser dividido em cinco regiões: a cárdia, o fundo, o corpo, o antro e o piloro (Figura 2). Este órgão muscular pode apresentar capacidade para até 1.500 ml de volume, sendo revestido por peritônio, que o protege externamente. O revestimento interno é recoberto por epitélio colunar dobrado que formam as criptas gástricas (fossetas) onde as glândulas gástricas liberam suas secreções (RUBIN E FARBER, 2002).

Figura 2. Anatomia do estômago



Fonte: Alzahrani et al 2014

Existem diversas patologias que acometem o estômago sendo a gastrite a mais frequente. 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).

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. A causa mais comum da gastrite crônica é a infecção pelo bacilo *Helicobacter pylori*, além de estresse psicológico, cafeína e uso de álcool e tabaco (GENTA, 1998).

Lesões *in situ* pré-neoplásicas podem ser reconhecidas como é o caso da metaplasia e displasia. 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, forma e orientação do epitélio junto com a textura da cromatina podendo ocorrer hipertrofia e hiperchromasia (OHBA E IJIMA, 2016).

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. 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, 2004; FOX, WANG, 2007; INCA, 2010).

O desenvolvimento dessa patologia é considerado multifatorial e sendo assim apresenta fatores ambientais e genéticos envolvidos, tais como tabagismo, a infecção pelo *Helicobacter pylori*, população de baixa renda, classificação sanguínea do tipo A, raça amarela, ativação de genes supressores p53 e algumas variantes polimórficas (SANTOS, et. al 2015).

De acordo com o INCA o *H. pylori* é a segunda causa mais frequente quando se trata de doenças estomacais, onde cerca de 70% da população mundial encontra-se colonizada por essa bactéria, porém indivíduos com certa suscetibilidade genética desenvolvem a doença com mais facilidade (INCA, 2016).

São conhecidos além de fatores ambientais, os fatores genéticos do hospedeiro. Eles podem aumentar o risco para o câncer gástrico (AL-MONDHRI et al., 2006), mostrando que

é possível estabelecer uma relação entre essa patologia e os polimorfismos de uma variedade de genes humanos, os quais podem ou não modificar os efeitos decorrentes da exposição natural ao ambiente, o que diminui o aumento da suscetibilidade de indivíduos com a doença (NARDONE; MORGNER, 2003). A patogênese do câncer depende do acúmulo de instabilidade genética e alterações em fatores de crescimento, bem como em citocinas e receptores celulares, que podem contribuir para a carcinogênese do estômago. Muitas vias oncogênicas estão bem estabelecidas, como aquelas mediadas por reguladores do ciclo celular (ciclina E, ciclinas D1 e D2), fator nuclear- $\kappa$ B, ciclooxigenase-2 (COX-2) e receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR). Entretanto têm surgido evidências da importância de outras vias e marcadores moleculares associados aos polimorfismos (SMITH et al., 2006; WU et al., 2010, OHBA E IJIMA, 2016).

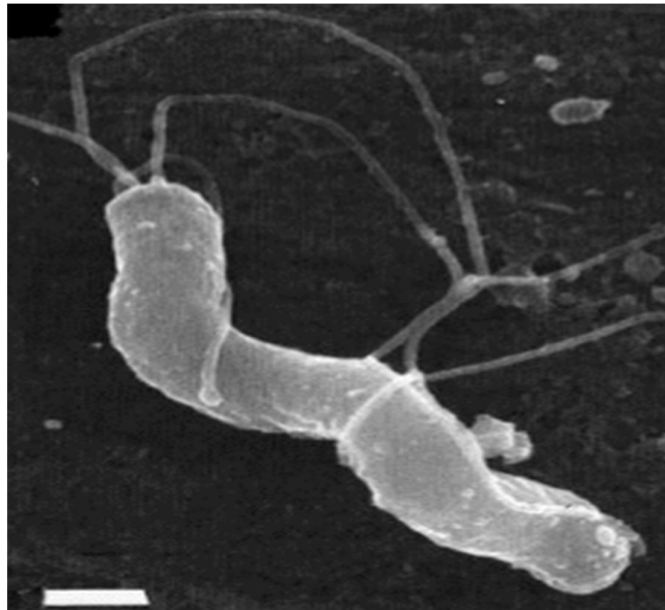
Em pacientes com câncer gástrico, alguns polimorfismos têm sido relatados associados com risco aumentado para a doença e estudados como possíveis biomarcadores para predição desta neoplasia (GAO; NIETERS; BRENNER, 2009). Estes polimorfismos estão relacionados a diversas vias moleculares que participam da carcinogênese, como genes de reparo do DNA (*XPA*, *XPC*, *ERCC2*) que possuem um importante papel no reparo ao dano no DNA causado pelo processo inflamatório desencadeado pelo *H. pylori* (DONG et al, 2008). Pode-se ainda citar alguns polimorfismos em genes como de citocinas pró-inflamatórias (*IL-1B* e *TNFA*) e anti-inflamatórias (*IL-1RN*), quimiocinas (*IL8*) (EL-OMAR et al., 2000; ZHANG et al., 2008) e receptores do sistema imune (*TLRs*, receptores “*toll like*”) (HOLD et al., 2007, OLIVEIRA et al.,2013), importantes no padrão de resposta inflamatória desencadeada pelo *H. pylori*. Esses polimorfismos demonstram a importância dos carcinógenos ambientais junto à suscetibilidade para certos perfis genéticos individuais (MILNE et al., 2009; LAO SIRIEIX et al., 2010).

### **2.1.2 *Helicobacter pylori***

A infecção pelo microrganismo vem sendo descrita na literatura desde 1994, porém foi na década de 80 que ela foi isolada pela primeira vez por Marshall & Warren. É considerada pela Organização Mundial de Saúde um patógeno de classe I (KODAIRA; ECOBAR; GRISI 2002) e vem sendo associada com a gastrite crônica, úlceras pépticas, metaplasia intestinal e adenocarcinoma gástrico (DAWN; PEEK, 2006).

O *H. pylori* é um bacilo Gram negativo, que mede cerca de 3,5 x 0,5 µm e possui de 4 a 6 flagelos. Apresentam fatores de virulência que vão influenciar e auxiliar na colonização da mucosa gástrica, já que o pH estomacal é baixo (ácido), além de prover moléculas de sinalização ao sistema imune, onde servirá como fonte para o início da inflamação (CÉSAR; SILVA; TABAJARA, 2002). Além disso, possuem uma importante capacidade de secretar enzimas que irão degradar as glipoproteínas da mucosa, lesando as células (SMITH et al., 2006).

Figura 3. Microscopia eletrônica da bactéria *Helicobacter pylori* mostrando sua estrutura bacilar.



Fonte: Oliveira, C. S. B 2013.

A incidência de infecção por esta bactéria está diretamente relacionada com o nível socioeconômico, a idade e o país que habita. A contaminação geralmente acontece na infância, por via fecal-oral e por alimentos ou água contaminados com o micro-organismo. Para o *H. pylori* conseguir aderir-se ao epitélio gástrico é preciso atravessar a camada primária de muco espesso, isso corre pela presença de flagelos que facilita a colonização e adesão a superfície da mucosa considerando uma rápida motilidade do bacilo no parede do estômago (KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2009).

A fim de sobreviver e manter a infecção crônica, o *H. pylori* evoluiu adaptações com uma ampla variedade de mecanismos para auxiliar em sua adaptação ao ambiente

desagradável do estômago e persistir a uma resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (MULLER, 2011). Após a colonização do epitélio, a bactéria utiliza mecanismos que auxiliam na sua adaptação ao ambiente, através de uma enzima chamada urease. Esta por sua vez irá permitir hidrolisar a ureia gástrica em amoníaco e dióxido de carbono, proporcionando sua sobrevivência em um ótimo pH gástrico (CÉSAR; SILVA; TABAJARA, 2002).

Também existem evidências substanciais indicando que diferenças genéticas do microrganismo têm um papel no resultado clínico da infecção pelo *H. pylori*, particularmente de genes relacionados à virulência como, *cagA*, *vacA*, *iceA*, *babA* e *dupA* (SMITH et al., 2006). A infecção por um *cagA* está ligada com a redução de apoptose e pode agir para inibição da morte celular programada gástrico-epitelial. O gene *vacA* codifica uma citotoxina vacular, *vacA*, que estimula células epiteliais, à apoptose. Os seres humanos infectados por *vacA* de *H. pylori* expressa, demonstram um maior grau de gastrite. O *iceA* é induzido pelo contato com o epitélio e compreende duas variantes principais *iceA1*, onde é regulada pelo contato com a *H. pylori* por células epiteliais gástricas humanas, e em algumas populações está relacionada com a úlcera péptica; e *iceA2* onde sua função ainda é indefinida. 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, chegamos à conclusão de que pessoas, com *H. pylori* expressa, que possuem *babA*, *vacA* e *cagA* tem um maior risco para o desenvolvimento do câncer gástrico (SMITH et al., 2006; BECKERT et al., 2016).

Assim que se aloja na mucosa gástrica, ocorre a indução do processo inflamatório, seguido de infiltrado de neutrófilos e células mononucleares. Com isso, estimula a transcrição e síntese de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias, onde caso não ocorra um controle adequado da resposta imune, pode-se desencadear a carcinogênese gástrica (SUGIMOTO; YAMAOKA; FURUTA, 2010). Segundo Alzahrani, os múltiplos efeitos que a bactéria tem sobre as células epiteliais gástrica são: indução da apoptose, proliferação de células e a destruição de células epiteliais (ALZAHIRANI 2014).

### 2.1.3 Receptores Toll like

Os receptores *Toll likes* (TLRs) são expressos por diferentes tipos de células ao longo do trato gastrointestinal, e desempenham um papel muito importante em relação a regulação da resposta imune inata (LAGUNES et al, 2013). Não estão ligados apenas ao

reconhecimento microbiano, mas também estão envolvidos na eliminação de alguns patógenos, regulação da resposta inflamatória e na ativação da resposta imune adaptativa, uma resposta tardia (EL-OMAR; NG; HOLD, 2008).

Reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos, conhecidos como PAMPs (WANG, X. et al., 2013) e são importantes membros da resposta imune inata, onde seus genes têm sido descritos como altamente polimórficos. Isso pode causar em alguns indivíduos uma ativação excessiva da resposta imune e inflamação, o que torna propício o desenvolvimento de outras doenças, incluindo o câncer (EL-OMAR; NG; HOLD, 2008).

Atualmente, dez tipos de TLRs têm sido encontrados em humanos (SEYA et al, 2010). Dentre os receptores *toll like* encontra-se o TLR9, presente em células epiteliais gástricas e implicado no reconhecimento de bactérias e vírus, incluindo o *H. pylori*, sendo responsável pela resposta inicial através da ligação de oligonucleotídeos CpGs, presentes apenas em DNA bacteriano (HOLD et al., 2009). Um estudo recente demonstrou que há expressão aumentada dos receptores TLR9 em células tumorais gástricas (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2014).

O TLR9 tem sido descrito como altamente polimórfico e serve como um receptor de reconhecimento de padrões que sinaliza a presença de uma infecção (PARADOWSKA et al, 2016). O polimorfismo genético é denominado por alterações genéticas presentes nas sequências de DNA que podem tanto construir como destruir os sítios de reconhecimento. Essas alterações podem ocorrer em alguma sequência não codificadora do gene o que não causará alteração de nenhuma das funções, ou por outro lado ocorrer nas sequências codificadoras, que irá levar à produção de proteínas defeituosas (LIMA et al, 2006), onde esses genes polimórficos é considerado um dos mais relevantes motivos para o desenvolvimento de doenças pépticas (UNO; KATO; SHIMOSEGAWA, 2014).

Alguns polimorfismos existentes no TLR9 tem sido bem estudados, entre eles os *TLR9* -1486T/C (rs187084), -1237T/C (rs5743836) e +2848G/A (rs352140) que foram associados com doenças inflamatórias e autoimunes (CARVALHO et al., 2011; KALINDERI et al., 2013), sendo raros os estudos com tumores (MANDAL, GEORGE E MITTAL, 2012; DAI et al., 2014; FEHRI et al., 2014).

Na literatura, vem sendo descrito o desenvolvimento da via de sinalização dos TLRs em doença auto-imune e doenças inflamatórias (CASTAÑO-RODRÍGUEZ, 2014). Durante infecção por *H. pylori*, os TLR9 reconhecem oligonucleotídeos do tipo CpG, não metiladas, que são abundantes no DNA bacteriano, o que desencadeia alterações no equilíbrio celular e a

ativação de MAPKs e NF-Kb (WANG, 2015) e desempenham um papel importante para estabelecer uma resposta inflamatória a infecção por *H. pylori* (LAO, et al, 2015).

Curiosamente, o reconhecimento mediado por TLR9 é induzido principalmente intracelular. Além disso, um estudo tem sugerido que a sinalização TLR9 está envolvida na supressão da gastrite induzida por *H. pylori* na fase inicial da infecção através da regulação de citocinas de tipo Th1 modulada por IFN - $\alpha$ . Além disso, um estudo recente mostrou que o epitélio gástrico de crianças respondem à infecção por *H. pylori* através do aumento da expressão de receptores TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9. (CASTAÑO-RODRÍGUEZ, 2014).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo-se em vista a importância biológica destes receptores de padrões microbianos em diversas infecções e os poucos estudos da literatura com polimorfismos de receptores TLRs envolvidos na infecção gástrica pelo *H. pylori* e carcinogênese gástrica na população brasileira, bem como a escassez de trabalhos associando polimorfismos destes genes e expressão gênica. Este estudo teve como objetivo geral avaliar as amostras determinando as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do *TLR9* -1486T/C (rs187084) e a expressão gênica deste receptor.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *TLR9* -1486T/C (rs187084) nos grupos casos (Gastrite crônica e Câncer gástrico) e controle;
- ✓ Caracterizar o polimorfismo em associação com risco aumentado para as lesões gástricas avaliadas; como também para a infecção pelo *H. pylori*;
- ✓ Avaliar a expressão gênica relativa do RNAm e as possíveis associações entre os níveis de expressão gênica e as variantes polimórficas.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo dividiu-se em duas principais etapas: caracterização do polimorfismo *TLR9-1486T/C*- rs187084 e posterior análise da expressão gênica.

Na primeira etapa, as análises polimórficas foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética da Universidade do Sagrado Coração de Bauru-SP (USC), enquanto os ensaios de expressão gênica foram realizados 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 Projeto foi submetido a análise do Comitê de Ética e Pesquisa desta instituição, tendo sido aprovado com parecer número 382.514 (Anexo 1).

### 4.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE BIÓPSIAS GÁSTRICAS

Durante a execução deste trabalho foi firmada uma colaboração entre a Universidade do Sagrado Coração-USC e Hospital Estadual de Bauru (setor de Gastreenterologia) para a coleta de novas biópsias gástricas. Todos que aceitam participar do estudo preenchem um questionário, de onde são obtidos dados epidemiológicos como idade, raça e sexo (Anexo 2) e assinam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3). As biópsias gástricas são coletadas em tubos distintos contendo solução de RNA later, e estas são designadas a extração de DNA e RNA (protocolos descritos abaixo).

### 4.2 CAUSUÍSTICA

Todas as amostras incluídas foram obtidas de pacientes com queixas gástricas e atendidos no Serviço de Gastreenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília, Universidade Federal de São Paulo ou Hospital Estadual de Bauru, submetidos à endoscopia digestiva alta, e com idade variando entre 1 a 80 anos e que não receberam drogas quimioterápicas, antibióticos e inibidores de bombas de prótons.

Na Tabela 1 estão descritos os números amostrais para os grupos casos (Gastrite e Câncer) e Controle, sendo que o total de amostras foram de 503 pacientes. O grupo Câncer Gástrico foi formado por 58 pacientes, sendo todos positivos para *H. pylori*; o grupo Gastrite Crônica por 279 pacientes, sendo 146 positivos para *H. pylori* e 133 negativos para *H. pylori*;

já o grupo controle contém 166 pacientes que passaram por endoscopia, mas o exame histopatológico foi negativo para qualquer doença gástrica.

A segunda etapa refere-se à avaliação da expressão gênica do RNAm por PCR real time, para a qual foram utilizadas amostras de RNA de 48 pacientes com Gastrite Crônica, 23 pacientes com Câncer Gástrico e 14 pacientes Controle (Tabela 1).

Tabela 1. Número amostral dos grupos de Gastrite Crônica, Câncer Gástrico e Controle para o polimorfismo TLR9 -1486T/C.

Grupos Amostrais		DNA (n)	RNA (n)
Gastrite Crônica	<i>H. pylori</i> negativo	133	31
	<i>H. pylori</i> positivo	146	17
Câncer Gástrico	<i>H. pylori</i> positivo	58	23
Controle	<i>H. pylori</i> negativo	166	14
Total		<b>503</b>	<b>85</b>

Vale ressaltar, que as amostras foram fornecidas de forma randomizada e blindada 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.

### 4.3 ESTUDO MOLECULAR

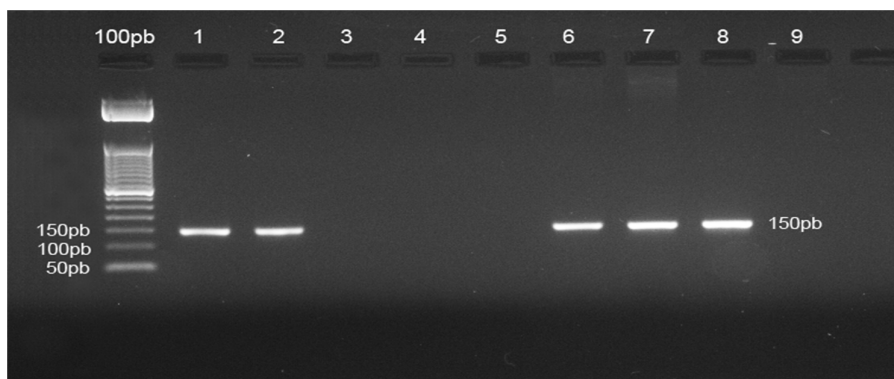
#### 4.3.1 Extração de DNA e Detecção molecular da *Helicobacter pylori*

A extração do DNA a partir das biópsias da região do antro do estômago foi realizada conforme protocolo estabelecido pelo Kit QiAmp da Qiagem.

Para a detecção de *H. pylori* através da técnica de PCR, foi utilizado um par de *primers*: F: TCCCAGCAGCAACAATTCATTA e R: CTGCTTGCAGTTGACTGTGT conforme sequências e protocolos descritos na literatura (CHEN et al., 2012) o qual amplifica um fragmento de 150pb referente ao fragmento da fração 16S do rRNA 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 4).

Figura 4. Padrão de migração eletroforético reação de PCR para *HPX*. Possui um 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 pelo autor.

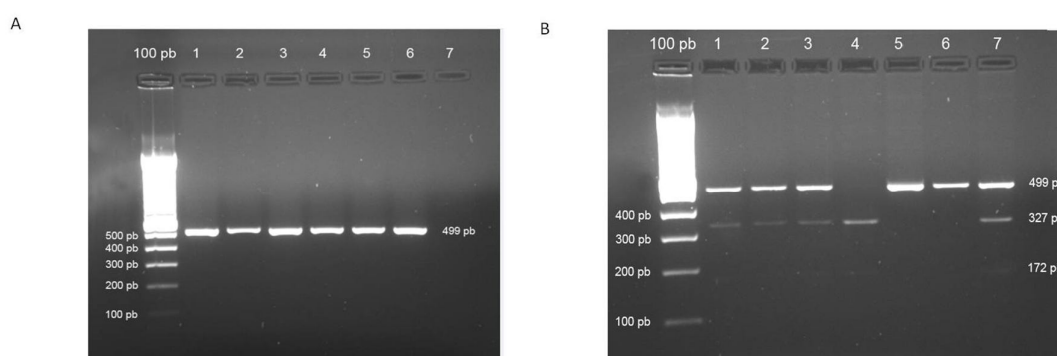
#### 4.3.2 Análise do polimorfismo TLR9 -1486T/C (rs187084)

O polimorfismo TLR9 -1486 T/C foi determinado por amplificação gênica empregando-se a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction/RestrictionFragmentLengthPolymorphism*). Para amplificar a região contendo o sítio polimórfico foram utilizados os *primers*: F: TCCCAGCAGCAACAATTCATTA e R: CTGCTTGCAGTTGACTGTGT conforme sequências e protocolos descritos na literatura (Tabela 2).

As PCR foram feitas para um volume final de 50µL onde foram utilizados 31,5 µL H<sub>2</sub>O, 5 µL de PCR Buffer, 5 µL dNTPs (1,23 µmol/L), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 4 µL de *primers* (25 µmol/L), 2 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 3 minutos para que ocorra a desnaturação. Posteriormente, para amplificação, foi 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 (©Invitrogen) com concentração de 1,5%, corado com brometo de etídio na presença de um marcador molecular de 100 pb. Após esta etapa,

10µL de produto da reação de PCR foram digeridos utilizando-se a enzima específica para a região polimórfica *AflIII*, que age a uma temperatura de 37° C em banho-maria over night (Figura 5). Os alelos foram identificados pelas regiões de corte conforme descrito na tabela 2.

Figura 5. Padrão eletroforético pela técnica de PCR-RFLP para TLR9-1486T/C. (A) bandas de 499 pb característico da amplificação do fragmento estudado do gene TLR9 e B) Padrão de corte da enzima *AflIII* para o polimorfismo. Colunas de 1-3 e 7: heterozigoto TC (499+327+172pb). Coluna 4: homozigoto selvagem TT (327+172pb); e Colunas 5 e 6: homozigoto polimórfico CC (499pb).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2. Polimorfismo e suas sequencias de primers e enzimas utilizadas, conforme referências da literatura.

Genes	Primers (5'-3')	Enzima	T(°C)	Fragmento	Referência
<b><i>TLR9 - 1486T/C rs187084</i></b>	F:TCCCAGCAGCAACAATT CATTA R:CTGCTTGCAGTTGACTG TGT	<i>AflIII</i>	37°	TT: 327+172pb TC: 499+327+172 pb CC: 499 pb	(LI et al., 2012)

### 4.3.3 Análise da Expressão gênica por RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) do gene TLR9

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 *GeneAmp PCR System 9700 (AppliedBiosystems)* e o cDNA estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A análise da expressão do *TLR9* foi realizada no termociclador automático (*ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System*) e a quantificação do RNA nas amostras utilizou os valores de Ct pela fórmula  $2(-\Delta\Delta\text{Ct})$  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 do gene foi selecionado pelo guia de seleção de genes da *Applied Biosystems - TLR9 (Hs00152973\_m1)*. Para determinar a eficiência de amplificação do iniciador foi construída uma curva-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 (AppliedBiosystems)*.

## 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos utilizou-se o teste exato de Fisher. Foi realizada uma análise regressiva multivariada para calcular a *Odds Ratios (OR)* e seus intervalos de confiança a 95% (95% IC) ajustados para os fatores de risco como sexo, idade, infecção pela *H. pylori* e seus fatores de virulência, seguindo 4 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), recessivo (alelos homozigotos de maior ocorrência + heterozigotos vs alelos homozigotos de menor ocorrência) e overdominante (heterozigotos vs pool de homozigotos).

Os dados de expressão gênica relativa foram apresentados como medianas para cada grupo, para o gene *TLR9* foi utilizado um método de detecção de *outliers* (MAROCO, 2007), sendo os outliers removidos em análises posteriores. 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 da *H. pylori* foi utilizado o teste de Mann-

Whitney para dados não paramétricos. Nas análises  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. 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.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO DO *TLR9* -1486 T/C - RS187084

Para o estudo do polimorfismo *TLR9* 1486C/T - rs187084 foram genotipadas 503 amostras pela técnica de PCR-RFLP, sendo 279 pacientes com Gastrite Crônica-GC (133 positivos e 146 negativos para o *H.pylori*), 166 pacientes Controles-C, com a mucosa gástrica normal (negativos para o *H. pylori*) e 58 pacientes com Câncer Gástrico-CG (positivos para *H. pylori*).

As frequências genotípicas para o Grupo de Gastrite Crônica para T/T, T/C e C/C foram de 34%, 47% e 18%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T foi de 0,58 e para C de 0,42. No grupo Câncer, as frequências genotípicas para T/T, T/C e C/C foram de 34%, 50% e 16%, respectivamente, enquanto as frequências alélicas para T foi de 0,59 e C de 0,41. No grupo Controle obteve-se uma frequência genotípica para T/T, T/C e C/C de respectivamente, 17%, 52% e 30%, enquanto a frequência alélica foi para T de 0,44 e para C de 0,56.

Também foram realizados agrupamentos entre as frequências genotípicas e alélicas comparando os grupos casos e controle. Na comparação entre os grupos Gastrite e Controle, observou-se uma diferença estatisticamente significativa nos modelos codominante para TC (OR= 0,46, 95%IC=0,28-0,76,  $p<0,0001$ ) e CC (OR=0,32, 95%IC=0,18-0,57,  $p<0,0001$ ) com relação ao genótipo homozigoto selvagem TT, no modelo dominante (OR=0,41, 95%IC=0,18-0,80,  $p<0,0001$ ) e modelo recessivo (OR=0,54, 95%IC= 0,34-0,84,  $p=0,0074$ ) (Tabela 3).

O mesmo efeito protetor foi observado na comparação entre os grupos Câncer Gástrico e Controle nos modelos codominante para TC (OR=0,27, 95% IC= 0,10-0,67,  $p=0,0048$ ) e CC (OR= 0,48, 95% IC= 0,23-0,98,  $p=0,0614$ ) com relação ao genótipo homozigoto TT, assim como no modelo dominante para TC+CC (OR= 0,40, 95% IC= 0,20-0,80,  $p=0,0100$ ). Na comparação da frequência alélica entre os grupos Gastrite e Controle (OR= 0,56, 95% IC= 0,42-0,73,  $p=0,0001$ ) e Câncer Gástrico e Controle (OR=0,52, 95% IC= 0,34-0,81,  $p=0,003$ ) também se observou um efeito protetor para o alelo C (Tabela 4).

Entretanto, não se observou qualquer associação estatisticamente significativa entre as comparações alélicas e genotípicas entre os grupos Gastrite Crônica e Câncer Gástrico (Tabela 5).

As amostras também foram agrupadas de acordo com a presença e ausência da bactéria *Helicobacter pylori*, formando-se um grupo *H. pylori* positivo (133 pacientes) e *H. pylori* negativo (146 pacientes). Na comparação entre estes dois grupos não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa tanto na frequência genotípica quanto na frequência alélica (OR= 0,79, 95% IC= 0,61-1,02, p= 0,082).



Tabela 3. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e overdominante nos grupos Controle vs Gastrite Crônica para o SNP TLR9- 1486 T/C, dados ajustados para os fatores de risco sexo e *H.pylori*.

Modelos TLR9 1486T/C	Genótipos/Alelos	Grupos dos pacientes			
		Controle n= 166 (100%)	Gastrite Crônica n=279 (100%)	OR (95%IC)	p
<b>Codominante</b>	T/T	29 (17,7%)	96 (34,4%)	1,00	<0,0001
	T/C	87 (53%)	132 (47,3%)	0,46 (0,28-0,76)	
	C/C	48 (29,3%)	51 (18,3%)	0,32 (0,18-0,57)	
<b>Dominante</b>	T/T	29 (17,7%)	96 (34,4%)	1,00	<0,0001
	T/C-C/C	135 (82,3%)	183 (65,6%)	0,41 (0,18-0,80)	
<b>Recessivo</b>	T/T-T/C	116 (70,7%)	228 (81,7%)	1,00	0,0074
	C/C	48 (29,3%)	51 (18,3%)	0,54 (0,34-0,84)	
<b>Overdominante</b>	T/T-C/C	77 (47%)	147 (52,7%)	1,00	0,260
	T/C	87 (53%)	132 (47,3)	0,80 (0,54-1,18)	
<b>Frequência Alélica</b>	T	0,44	0,58	1,00	0,0001
	C	0,56	0,42	0,56 (0,42-0,73)	

Tabela 4. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e overdominante nos grupos Controle vs Câncer Gástrico para o SNP TLR9- 1486 T/C, dados ajustados para os fatores de risco sexo e H.pylori.

Modelos TLR9 1486T/C	Genótipos/Alelos	Grupos dos pacientes			
		Controle n= 166 (100%)	Câncer gástrico n=58 (100%)	OR (95%IC)	p
<b>Codominante</b>	T/T	29 (17,7%)	20 (19%)	1,00	0,004
	T/C	87 (53%)	29 (18%)	0,48 (0,23-0,98)	
	C/C	48 (29,3%)	9 (8%)	0,27 (0,10-0,67)	
<b>Dominante</b>	T/T	29 (17,7%)	20 (9%)	1,00	0,010
	T/C-C/C	135 (82,3%)	38 (17%)	0,40 (0,20-0,80)	
<b>Recessivo</b>	T/T-T/C	116 (70,7%)	49 (22%)	1,00	0,053
	C/C	48 (29,3%)	9 (4%)	2,25 (1,02-4,94)	
<b>Overdominante</b>	T/T-C/C	77 (47%)	29 (13%)	1,00	0,760
	T/C	87 (53%)	29 (13%)	1,13 (0,62-2,05)	
<b>Frequência Alélica</b>	T	0,44	0,59	1,00	0,003
	C	0,56	0,41	0,52 (0,34-0,81)	

Tabela 5. Análise das frequências genótípicas e alélicas nos modelos codominante, dominante, recessivo e overdominante nos grupos Gastrite vs Câncer para o *SNP TLR9 1486 T/C* dados ajustados para os fatores de risco sexo e *H.pylori*.

Modelo <i>TLR9 1486 T/C</i>	Genótipos/ Alelos	Grupos dos pacientes			
		Câncer N=58(100%)	Gastrite N=279 (100%)	OR (95%IC)	P
<b>Codominante</b>	T/T	20 (34,5%)	125 (28,2%)	1,00	0,45
	T/C	29 (50%)	219 (49,4%)	0,80 (0,43-1,50)	
	C/C	9 (15,5%)	99 (22,4%)	0,59 (0,25-1,37)	
<b>Dominante</b>	T/T	20 (34,5%)	125 (28,2%)	1,00	0,32
	T/C-C/C	38 (65,5%)	318 (71,8%)	0,74 (0,41-1,34)	
<b>Recessivo</b>	T/T-T/C	49 (84,5%)	344 (77,7%)	1,00	0,29
	C/C	9 (15,5%)	99 (22,4%)	0,67 (0,32-1,43)	
<b>Overdominante</b>	T/T-C/C	29 (50%)	224 (50,6%)	1,00	0,94
	T/C	29 (50%)	219 (49,4%)	0,98(0,56-1,71)	
<b>Frequência Alélica</b>	T	0,59	0,53	1,00	0,198
	C	0,41	0,47	0,75 (0,51-1,12)	

## 5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Os níveis de expressão gênica relativa para *TLR9* podem ser visualizados na Tabela 5 e Figura 6. Observou-se, que para este gene, um aumento significativo nos níveis de expressão gênica relativa no grupo de Câncer Gástrico, cujas amostras apresentaram mediana de RQ= 6,887, com relação aos demais grupos avaliados, onde o grupo Controle apresentou mediana de RQ= 1,042 e grupo Gastrite Crônica com mediana de RQ= 1,456. Assim, houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos Câncer vs Controle (p= 0,0002) e Câncer vs Gastrite (p= 0,0001), mas não entre os grupos Gastrite vs Controle (p= 0,1912).

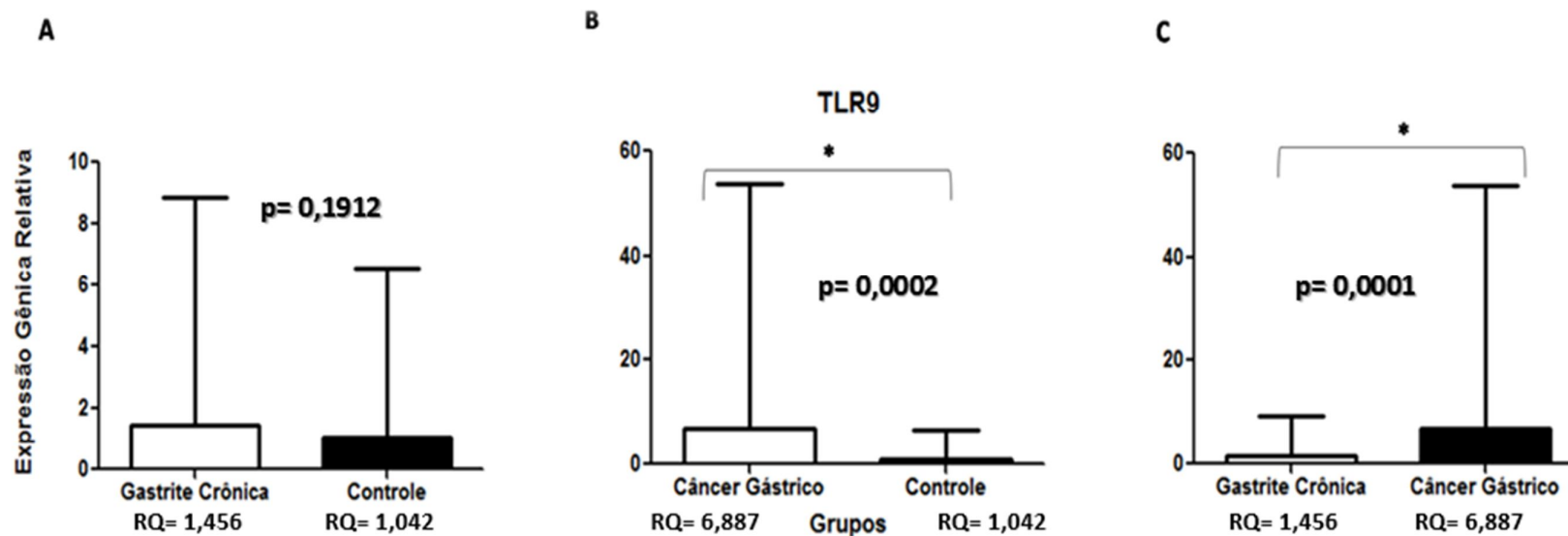
Em outra análise, as amostras foram separadas de acordo com o genótipo do polimorfismo avaliado *TLR9*-1486 TC (Figura 7). Assim, no grupo Controle, indivíduos portadores dos genótipos TT apresentaram um aumento nos níveis de expressão gênica relativa (mediana de RQ= 4,727) em comparação a mediana dos indivíduos portadores do alelo polimórfico TC+CC (mediana de RQ= 0,4498), diferença que foi estatisticamente significativa (p= 0,0240). No grupo de Gastrite Crônica, indivíduos portadores dos genótipos TT apresentaram níveis de expressão gênica relativa semelhante (mediana de RQ= 0,9966) aos indivíduos portadores do alelo polimórfico TC+CC (mediana de RQ=1,543), (p= 0,1948). Para o grupo Câncer Gástrico, também não houve diferença estatisticamente significativa, sendo que indivíduos portadores dos genótipos TT apresentaram mediana de RQ= 9,905 e indivíduos portadores do alelo polimórfico TC+CC mediana de RQ= 8,581, p= 1,000 (Figura 7).

Tabela 6. Níveis de expressão gênica relativa de *TLR9* para os grupos de Gastrite Crônica-GC, Câncer Gástrico-CG e Controle-C.

<i>Variáveis</i>	Controle- C (n=14)	<i>TLR9</i> Grupos Casos	
		Câncer Gástrico-CG (n=23)	Gastrite Crônica -GC (n=48)
<b>Mediana</b>	1,042	6,887	1,456
<b>Intervalo (25-75 Percentil)</b>	0,335- 3,688	2,858-12,26	0,7590-2,700
<b>P</b>		0,0002	0,1912
			0,0001

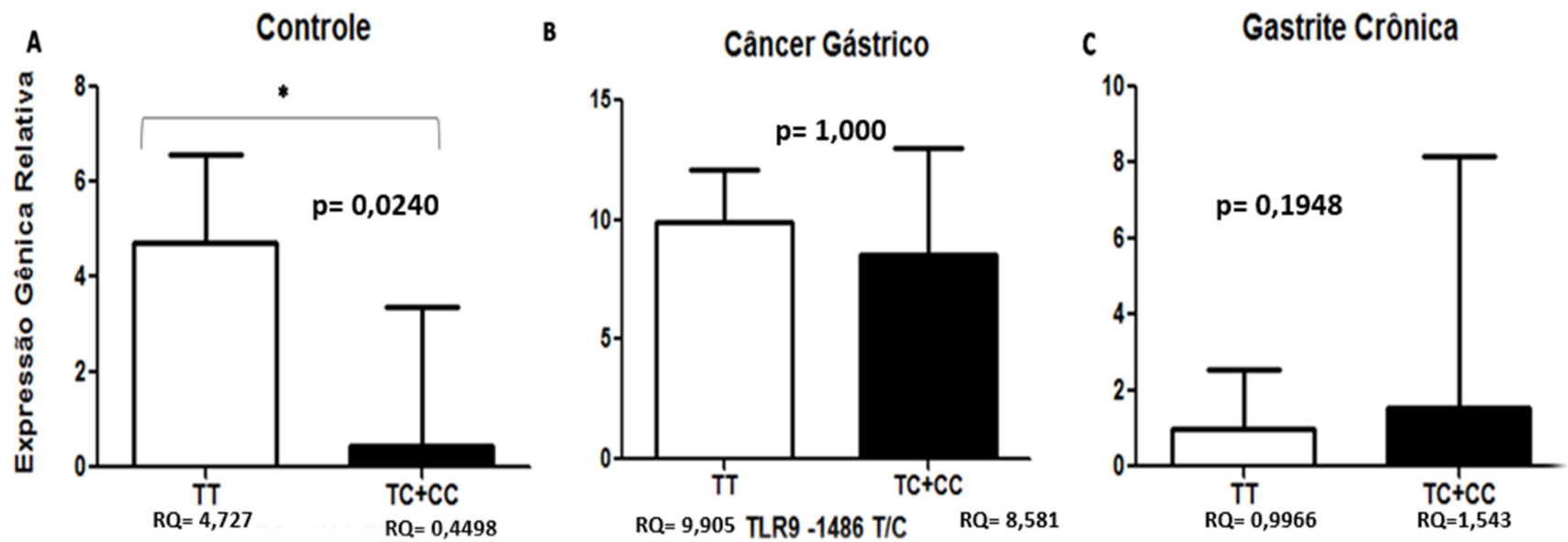
Analises estatísticas: Mann Whitney teste

Figura 6. Expressão gênica para o *gene TLR9* entre grupos estudados. A) Comparação de mediana de RQ dos grupos Gastrite Crônica e Controle ( $p=0,1912$ ); B) Comparação de mediana de RQ dos grupos Câncer Gástrico e Controle ( $p=0,0002$ ) e C) Comparação de mediana de RQ dos grupos Câncer Gástrico e Gastrite Crônica ( $p=0,0001$ ). \*Diferença estatisticamente significativa  $p<0,05$ . RQ=Quantificação Relativa. Tratamento de outliers.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7. Expressão gênica para *gene TLR9* comparando genótipos estudados. A) Grupo Controle ( $p=0,0240$ ); B) Grupo Câncer Gástrico ( $p=0,6378$ ); C) Grupo Gastrite Crônica ( $p=0,3392$ ). Diferença estatisticamente significativa  $p<0,05$ . Tratamento de outliers.



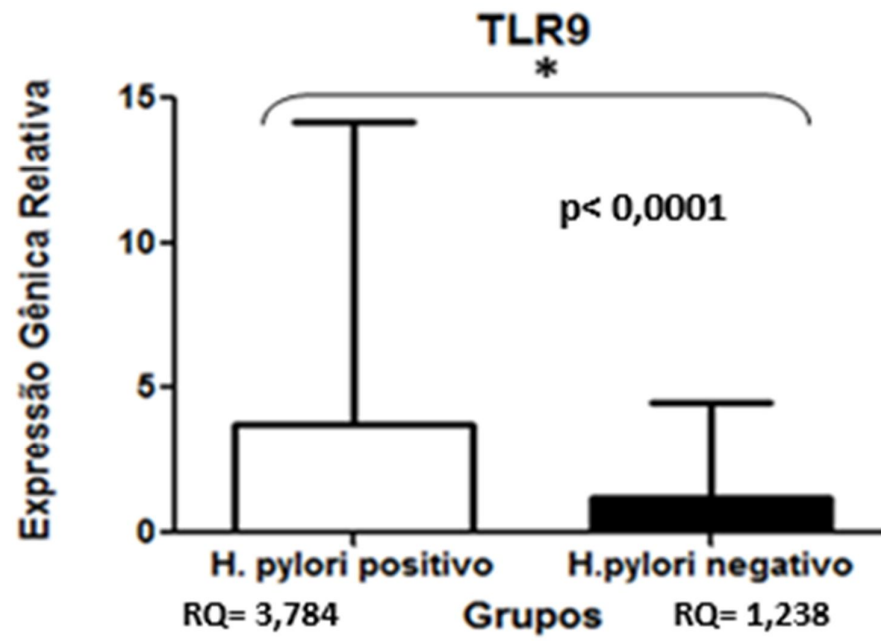
Fonte: Elaborado pelo autor

Para finalizar foi realizado um agrupamento com relação à 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 *TLR9*, ficou demonstrada uma expressão gênica aumentada entre os indivíduos do grupo *H. pylori* positivo (mediana de RQ= 3,784) em relação ao grupo *H. pylori* negativo (mediana de RQ= 1,238),  $p < 0,0001$  (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 7. Níveis de expressão gênica relativa do gene *TLR9* para os grupos de *H. pylori* positivo e negativo.

Variáveis	<i>TLR9</i> Grupos Casos	
	<i>H. pylori</i> positivo (n= 40)	<i>H. pylori</i> negativo (n= 45)
Mediana	3,784	1,238
Intervalo (25-75 Percentil)	1,558-8,581	0,5484-2,415
p	< 0,0001	

Figura 8. Expressão gênica nos grupos *H. pylori* positivo e negativo. Valor de  $p < 0.0001$ ). \*Diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$ . RQ =Quantificação Relativa. Tratamento de outliers.



Fonte: Elaborado pelo autor



## 6. DISCUSSÃO

A infecção gástrica persistente do agente patogênico *H. pylori* normalmente provoca um processo inflamatório caracterizado como gastrite, a qual predispõe a um risco elevado para o desenvolvimento do câncer gástrico (MULLER, 2011). Polimorfismos em genes de receptores do sistema imune influenciam o perfil de resposta aos agentes infecciosos, como a infecção pela *H. pylori*, podendo contribuir para variações no risco da carcinogênese gástrica (CHENG, X. J.; LIN, J. C.; TU, S. P., 2016). Assim, neste estudo, foi demonstrada uma associação protetora dos genótipos *TLR9 1486 C/C* e *T/C + CC* no desenvolvimento de Gastrite Crônica e Câncer Gástrico quando comparado com o grupo Controle, assim como um aumento de expressão dos receptores TLR9 no grupo de Câncer Gástrico e *H. pylori* positivos.

Os TLRs participam do reconhecimento inicial da bactéria *H. pylori* na mucosa gástrica, e diferentes SNPs presentes nestes receptores estão associados com uma resposta inflamatória mais potente (DREXLER E FOXWELL, 2010). O SNP *TLR9-1486T/C* foi relatado com alta heterozigosidade na população mundial, (PARADOWSKA, E, 2016), mas não há estudos com câncer gástrico na população brasileira, nem associação com níveis de expressão gênica de seus receptores.

O gene *TLR9* é localizado no cromossomo 3p21.3 e consiste de 2 exons, (NOVAK et al., 2007). O polimorfismo *TLR9 1486 T/C*, rs187084, está localizado no exon 2 do cromossomo 3 e induz uma variação sinônima P545P. O MAF é considerado 0,3776 para o alelo C polimórfico, bem abaixo da frequência encontrada no presente estudo, o qual demonstrou frequência alélica de 0,56 para o alelo C no grupo Controle. Em uma recente meta-análise que analisou a influência de diversos polimorfismos nos receptores TLR4 e TLR9 e o risco de tuberculose pulmonar em populações caucasianas, asiáticas e africanas concluiu que não ficou demonstrado qualquer associação deste polimorfismo em nenhum dos modelos aplicados (ZHAO et al., 2015). Já outra meta-análise que avaliou a associação de polimorfismos do *TLR9* (rs187084, rs352140, e rs5743836) e risco de câncer, encontrou uma associação positiva para o SNP rs187084 com o aumentado risco de câncer (CC vs TC+TT: OR=1,14, 95% CI=1,02-1,28), especialmente câncer cervical (C vs T: OR=1,19, 95% CI=1,05-1,34; TC vs TT: OR=1,32, 95% CI=1,10-1,58; CC vs TT: OR=1,31, 95% CI= 1,03-1,68; CC+TC vs TT: OR=1,32, 95% CI=1,11-1,56) (WAN et al., 2014). Enquanto, Ashton et al., 2010 encontrou uma associação protetora da combinação de alelos (rs5743836 alelo C e

rs187084 alelo C) e o risco para câncer endometrial. Relatos que demonstram dados conflitantes presentes na literatura (ASHTON et al., 2010).

Também ficou demonstrado no presente trabalho um aumento da expressão gênica no grupo Câncer Gástrico (RQ= 6,887), a qual representou diferença estatisticamente significativa com relação aos grupos Controle (0,0002) e Gastrite (0,0001). A ativação do TLR9 permite o aumento da atividade transcricional de NF- $\kappa$ B e produção de citocinas com perfil pró-inflamatório (ASHTON et al., 2010), assim, a presença da *H. pylori* estaria modificando a resposta individual, já que todas as amostras do grupo Câncer Gástrico eram positivas para bactéria.

O aumento da expressão de TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 no epitélio gástrico de pacientes com *H. pylori* está associada a um aumento na expressão de IL-8, TNF-a e IL-10. Isso indica que, no início da infecção, é induzida a expressão de TLRs e de citocinas pró e antiinflamatórias pelas células epiteliais gástricas, iniciando um processo inflamatório crônico que continuará por décadas, desencadeando a carcinogênese gástrica (LAGUNES-SERVIN,H, et al, 2013). Esta associação da bactéria *H. pylori* e aumento da expressão dos receptores TLR9 no nosso estudo também foi visto quando as amostras foram estratificadas quanto a presença e ausência deste patógeno, o que demonstrou um aumento significativo da expressão deste receptor nas amostras infectadas pela bactéria (RQ=3,784) com relação as amostras sem infecção (RQ=1,238).

Outro estudo que avaliou mais de 2000 indivíduos na busca da associação do polimorfismo TLR9-1486 T/C com a doença neurodegenerativa de Alzheimer também conseguiu demonstrar o efeito protetor do alelo C e do genótipo CC no desenvolvimento do Alzheimer. Este mesmo grupo também avaliou a expressão do receptor TLR9 em monócitos sanguíneos e demonstraram um aumento de expressão de TLR9 entre os pacientes de genótipo CC, concluindo que a funcionalidade do receptor pode alterar com a presença do polimorfismo (WANG et al., 2013). Entretanto em nosso estudo, quando os grupos foram estratificados de acordo com as variantes polimórficas não se conseguiu verificar diferenças estatisticamente significante dentro dos grupos Gastrite e Câncer Gástrico para os pacientes TT em relação aos TC+CC, esta diferença foi vista dentro do grupo Controle, todos sem infecção pela bactéria *H. pylori*, onde homozigotos polimórficos TT apresentaram maior expressão do receptor (p=0,0240). Entretanto, o nosso número amostral ainda é uma limitação e o aumento dos indivíduos nas análises de expressão podem alterar estes resultados.

Assim, o polimorfismo funcional localizado na região promotora TLR9 rs187084, pode regular os níveis de transcritos e proteínas funcionais, e diversos estudos tem tentado a sua associação em várias doenças infecciosas e inflamatórias como malária (OMAR et al., 2012), câncer cervical (CHEN et al., 2012), artrite reumatoide (LEE, BAE E SONG, 2013) e citomegalovírus (PARADOWSKA et al., 2016), mas o presente estudo foi o primeiro a demonstrar na população brasileira a associação protetora do alelo C e Genótipos TC+CC para o risco de desenvolvimento de Gastrite e Câncer Gástrico, assim como a aumentada expressão do receptor TLR9 entre os pacientes *H. pylori* positivos, caracterizando que o processo inflamatório exacerbado contra a bactéria pode estar associado a carcinogênese.

## 7. CONCLUSÕES

- Os genótipos do polimorfismo *TLR9* rs187084, TT, TC e CC foram analisados em pacientes com gastrite crônica (34%, 47% e 18%, respectivamente), câncer gástrico (34%; 50% e 16%, respectivamente), e em pacientes saudáveis (17%, 52% e 30%, respectivamente).
- As correlações entre os grupos demonstraram uma associação protetora do genótipo CC e da associação TC+CC na comparação entre os grupos Gastrite e Controle nos modelos co-dominante ( $p < 0,0001$ ), dominante ( $p < 0,0001$ ) e ( $p = 0,0074$ ). O mesmo efeito protetor foi observado na comparação entre os grupos Câncer Gástrico e Controle no modelo co-dominante para TC ( $p = 0,004$ ) e CC ( $p = 0,061$ ) com relação ao genótipo homocigoto TT, assim como no modelo dominante ( $p = 0,0100$ ). Na comparação da frequência alélica entre os grupos Gastrite e Controle e Câncer Gástrico e Controle também se observou um efeito protetor do alelo C para o desenvolvimento das lesões avaliadas.
- Nas análises de expressão gênica, houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos Câncer vs Controle ( $p = 0,0002$ ) e Câncer vs Gastrite ( $p = 0,0001$ ), mas não entre os grupos Gastrite vs Controle ( $p = 0,1912$ ). Em outra análise, onde as amostras foram separadas de acordo com os genótipos dos polimorfismos, houve um aumento significativo da expressão em indivíduos portadores do genótipo TT nos grupos Controle, mas nos demais grupos não foram evidenciados nenhum tipo de diferença significativa. Entretanto, houve um aumento da expressão do receptor *TLR9* no grupo *H. pylori* positivo com relação ao grupo *H. pylori* negativo ( $p < 0,0001$ ).

## REFERÊNCIAS

- ADEREM, A; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p.782-787, 17 ago. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35021228>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963608>>. Acesso em: 4 out. 2015.
- AL-MOUNDHRI, Mansour S. et al. Interleukin-1 $\beta$  gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. **Gastric Cancer**, v. 9, n. 4, p.284-290, 24 nov. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10120-006-0392-5>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17235630>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- ALZHRANI, S. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 20, n. 36, p.127-167, set. 2014. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12767>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4177462/>>. Acesso em: 6 out. 2016.
- ASHTON, K. et al. Toll-Like Receptor (TLR) and Nucleosome-binding Oligomerization Domain (NOD) gene polymorphisms and endometrial cancer risk. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.370-382, 21 jul. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-382>. Disponível em: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-382>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- BACKERT, S. et al. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**, [s.l.], v. 21, p.19-25, 16 ago. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/hel.12335>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27531534>>. Acesso em: 9 nov. 2016.
- BAE, M. et al. Protective effect of Korean Red Ginseng extract against Helicobacter pylori-induced gastric inflammation in Mongolian gerbils. **Journal Of Ginseng Research**, v. 38, n. 1, p.8-15, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2013.11.005>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24558304>>. Acesso em: 7 nov. 2015.
- CARVALHO, A. et al. The C Allele of rs5743836 Polymorphism in the Human TLR9 Promoter Links IL-6 and TLR9 Up-Regulation and Confers Increased B-Cell Proliferation. **Plos One**, v. 6, n. 11, 23 nov. 2011. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028256>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132241>>. Acesso em: 8 ago. 2016.
- 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, 2 abr. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060327>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565226>>. Acesso em: 7 set. 2016.

CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N; KAAKOUSH, N. O.; MITCHELL, H. M.. Pattern-Recognition Receptors and Gastric Cancer. **Front. Immunol.**, v. 5, n. -, p.1-10, 22 jul. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00336>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105827/>>. Acesso em: 10 out. 2016.

CHELI, R.; GIACOSA, A. Chronic atrophic gastritis and gastric mucosal atrophy--one and the same. **Gastrointest Endosc**, v. 29, n. 1, p. 23-5, Feb 1983. ISSN 0016-5107. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6826003>>. Acesso em: 9 ago. 2016.

CHEN, X. et al. A Genetic Variant in the Promoter Region of Toll-Like Receptor 9 and Cervical Cancer Susceptibility. **Dna And Cell Biology**, v. 31, n. 5, p.766-771, maio 2012. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2011.1427>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+Genetic+Variant+in+the+Promoter+Region+of+Toll-Like+Receptor+9+and+Cervical+Cancer+Susceptibility>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

CHENG, X. J.; LIN, J. C.; TU, S. P. Etiology and Prevention of Gastric Cancer. **Gastrointestinal Tumors**, v. 3, n. 1, p.25-36, set. 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000443995>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5040890/>>. Acesso em: 11 out. 2016.

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>>. Acesso em: 7 nov. 2015.

DAI, Q. et al. Polymorphisms of Toll-like receptor 9 are associated with nasopharyngeal carcinoma susceptibility. **Tumor Biol.**, v. 35, n. 4, p.3247-3253, 7 fev. 2014. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-013-1424-5>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24504675>>. Acesso em: 9 ago. 2016.

de 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>>.

DONG, L. M. et al. Genetic Susceptibility to Cancer. **Jama**, v. 299, n. 20, p.2423-2436, 28 maio 2008. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.299.20.2423>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2772197/>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

DREXLER, S. K.; FOXWELL, B. M.. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 4, p.506-518, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2009.10.009>.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837184>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

EL-OMAR, M; NG, M T; HOLD, G L. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p.244-252, 7 jan. 2008. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210912>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18176606>>. Acesso em: 6 out. 2016.

EL-OMAR, E. M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, [s.l.], v. 404, n. 6776, p.398-402, 23 mar. 2000. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1038/35006081>. Disponível em:

<<http://www.nature.com/nature/journal/v404/n6776/abs/404398a0.html>>. Acesso em: 11 out. 2016.

FEHRI, E. et al. Expression of Toll-like receptor 9 increases with progression of cervical neoplasia in Tunisian women--a comparative analysis of condyloma, cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 15, p. 6145-50, 2014. ISSN 1513-7368. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124588> >. Acesso em: 9 out. 2016.

FERNANDEZ-GARCIA, B. et al. Clinical Significance of Toll-like Receptor 3, 4, and 9 in Gastric Cancer. **Journal Of Immunotherapy**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.77-83, 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

<http://dx.doi.org/10.1097/cji.000000000000016>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24509170>>. Acesso em: 6 ago. 2016.

GAO, L.; NIETERS, A.; BRENNER, H. Cell proliferation-related genetic polymorphisms and gastric cancer risk: systematic review and meta-analysis. **European Journal Of Human Genetics**, v. 17, n. 12, p.1658-1667, 17 jun. 2009. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2009.102>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=H.+Cell+proliferation-related+genetic+polymorphisms+and+gastric+cancer+risk:+systematic+review+and+meta-analysis.>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

GENTA, R. M. Gastric atrophy and atrophic gastritis--nebulous concepts in search of a definition.. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, p.17-23, 1998. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gastric+atrophy+and+atrophic+gastritis+%E2%80%93+nebulous+concepts+in+search+of+a+definition>>. Acesso em: 10 set. 2016.

HOLD, G. L. et al. A Functional Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 Gene Increases Risk of Gastric Carcinoma and Its Precursors. **Gastroenterology**, v. 132, n. 3, p.905-912, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.026>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324405>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

HOLD, G. L. et al. CD14-159C/T and TLR9-1237T/C polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in Caucasian populations. **European Journal Of Cancer Prevention**, v. 18, n. 2, p.117-119, abr. 2009. Ovid Technologies (Wolters

Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cej.0b013e3283101292>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19337058>>. Acesso em: 4 out. 2016.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. 2010. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2009/lançamento\\_estimativa\\_2010](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2009/lançamento_estimativa_2010)> Acesso em: 7 nov. 2015.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>>. Acesso em: 15 de ago. 2016.

ISRAEL, D. A.; PEEK, R. M. The role of persistence in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 22, n. 1, p. 3-7, Jan 2006. ISSN 0267-1379. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319669>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

KALINDERI, K. et al. TLR9 -1237 T/C and TLR2 -194 to -174 del polymorphisms and the risk of Parkinson's disease in the Greek population: a pilot study. **Neurological Sciences**, v. 34, n. 5, p.679-682, 3 maio 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-012-1106-x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552867>>. Acesso em: 8 ago. 2016.

KODAIRA, Marcia S; ESCOBAR, Ana Maria de Ulhôa; GRISI, Sandra (Org.). [Http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102002000300017](Http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102002000300017). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 3, n. 36, p.1-10, jun. 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102002000300017](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102002000300017)>. Acesso em: 11 out. 2016.

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>>. Acesso: 7 nov. 2015.

KUIPERS, E.J. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. **Aliment Pharmacol. Ther**, v.13, p.3-11, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209681>>. Acesso em: 7 nov. 2015.

KUTIKHIN, A. G. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. **Human Immunology**, v. 72, n. 2, p.193-206, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.11.003>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21081146>>. Acesso em: 25 set. 2015.

LAGUNES-SERVIN, H. et al. Toll-Like Receptors and Cytokines are Upregulated during *Helicobacter pylori* Infection in Children. **Helicobacter**, v. 18, n. 6, p.423-432, 22 jul. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/hel.12067>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869400>>. Acesso em: 6 out. 2016.



- LAO, A. T. et al. Polymorphisms in TLR9 but not in TLR5 increase the risk for duodenal ulcer and alter cytokine expression in the gastric mucosa. **Innate Immunity**, v. 21, n. 7, p.706-713, 20 maio 2015. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1753425915587130>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25995217>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- LAO-SIRIEIX, P.; CALDAS, C.; FITZGERALD, R.C. Genetic predisposition to gastro-oesophageal cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 20, p.210-217, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347291>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- LEE, Y.H.; BAE, S.-c.; SONG, G.g.. Meta-analysis demonstrates association between TLR polymorphisms and rheumatoid arthritis. **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.328-334, ago. 2013. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.february.7.2>. Disponível em: <<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2013/vol12-1/pdf/gmr1859.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2016.
- 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>>.
- LIMA, J. M. et al. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Gastroenterol**, São Paulo, v. 43, n. 1, ago. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ag/v43n1/29147.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- LIU, S. et al. Toll-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to Epstein-Barr virus-associated and -negative gastric carcinoma in Northern China. **Saudi J Gastroenterol**, v. 21, n. 2, p. 95-103, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 1998-4049. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843196>>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- MANDAL, R. K.; GEORGE, G. P.; MITTAL, R. D. Association of Toll-like receptor (TLR) 2, 3 and 9 genes polymorphism with prostate cancer risk in North Indian population. **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 39, n. 7, p.7263-7269, 6 fev. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-1556-5>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311043>>. Acesso em: 8 ago. 2016.
- MAROCO J: **Análise Estatística de dados com utilização do SPSS**. 3ª Ed. Lisboa-Portugal; 2007.
- MILNE, A. N. et al. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. **Human Genetics**, [s.l.], v. 126, n. 5, p.615-628, 6 ago. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-009-0722-x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nature+meets+nurture:+molecular+genetics+of+gastric+cancer>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

MÜLLER, Anne; OERTLI, Mathias; ARNOLD, Isabelle C. H. pylori exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. **Cell Communication And Signaling**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.9-25, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1478-811x-9-25>. Disponível em: <<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-25>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

MULLER, L. B. et al. Prevalência da Infecção por Helicobacter Pylori e das lesões precursoras do câncer gástrico em pacientes dispépticos. **Arq Gastroenterol**. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-28032007000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032007000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 14 abr. 2016.

NARDONE, G.; MORGNER, A. Helicobacter pylori and gastric malignancies. **Helicobacter**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.44-52, out. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-5378.2003.00160.x>. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1523-5378.2003.00160.x/abstract;jsessionid=7DBE185099BBD04F360FDAA7DBC87BD9.f02t04>>. Acesso em: 10 out. 2016.

NOVAK, N. et al. Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. **Allergy**, [s.l.], v. 62, n. 7, p.766-772, 15 jun. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01358.x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573724>>. Acesso em: 11 nov. 2016.

OHBA, Reina; IJIMA, Katsunori. Pathogenesis and risk factors for gastric cancer after Helicobacter pylori eradication. **World Journal Of Gastrointestinal Oncology**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.663-672, 2016. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v8.i9.663>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27672424>>. Acesso em: 10 set. 2016.

OMAR, A. H et al. Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study. **Malar J**, v. 11, n. 1, p.168-11, nov. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-168>. Disponível em: <<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-168>>. Acesso em: 11 out. 2016.

PARADOWSKA, E. et al. TLR9 -1486T/C and 2848C/T SNPs Are Associated with Human Cytomegalovirus Infection in Infants. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 4, 22 abr. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154100>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27105145>>. Acesso em: 10 out. 2016.

PELETEIRO, B. et al. Association Between Cytokine Gene Polymorphisms and Gastric Precancerous Lesions: Systematic Review and Meta-analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.762-776, 1 mar. 2010. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-09-0917>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200422>>. Acesso em: 2 maio 2016.

RUBIN, R; Farber, J.L. **Patologia**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SANTOS, A. S. dos et al. Adenocarcinoma gástrico. **Arquivos Médicos**, São Paulo, v. 3, n. 60, p.156-158, set. 2015. Disponível em: <[http://www.fcmsantacasasp.edu.br/images/Arquivos\\_medicos/600/60/CE07.pdf](http://www.fcmsantacasasp.edu.br/images/Arquivos_medicos/600/60/CE07.pdf)>. Acesso em: 7 jul. 2016.

SCHOLTE, G. H. et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy. **The American Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 97, n. 7, p.1687-1695, jul. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05775.x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Genotyping+of+helicobacter+pylori+in+paraffin-embedded+gastric+biopsy+specimens:+Relation+to+histological+parameters+and+effects+on+therapy>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

SEYA, T. et al. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. **Cancer Science**, [s.l.], v. 101, n. 2, p.313-320, fev. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01442.x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059475>>. Acesso em: 10 out. 2016.

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>>. Acesso em: 10 out. 2016.

SMITH, S. M. Role of Toll-like receptors in *Helicobacter pylori* infection and immunity. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 5, n. 3, p. 133-46, Aug 2014. ISSN 2150-5330. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133016>>. Acesso em: 3 out. 2015.

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>>. Acesso em: 7 nov. 2015.

TAHARA, T. et al. Toll-like receptor 2 196 to 174 del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. **Cancer Science**, [s.l.], v. 98, n. 11, p.1790-1794, nov. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00590.x>. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2007.00590.x/full>>. Acesso em: 23 set. 2016.

TAKAISHI, S.; OKUMURA, T.; WANG, T. C.. Gastric Cancer Stem Cells. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 26, n. 17, p.2876-2882, 10 jun. 2008. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2007.15.2603>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539967>>. Acesso em: 6 mar. 2016.

UNO, K.; KATO, K.; SHIMOSEGAWA, T. Novel role of toll-likereceptors in Helicobacter pylori – inducedgastricmalignanc. **World Journal ofGastroenterology**, Beijing, v. 20, n. 18, p. 5244-5251, maio 2014. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i18/5244.htm>>. Acesso em: 25 ago. 2015

WAN, Guo-xing et al. Associations Between TLR9 Polymorphisms and Cancer Risk: Evidence from an Updated Meta-analysis of 25,685 Subjects. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [s.l.], v. 15, n. 19, p.8279-8285, 23 out. 2014. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.19.8279>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339018>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

WANG, Fangyu et al. Genetic polymorphisms of CD14 and Toll-like receptor-2 (TLR2) in patients with ulcerative colitis. **Journal Of Gastroenterology And Hepatology**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.925-929, jun. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04909.x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565650>>. Acesso em: 15 abr. 2016.

WANG, X. et al. TLR9 Promoter Polymorphism Is Associated with Both an Increased Susceptibility to Gastric Carcinoma and Poor Prognosis. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 6, p. e65731, 12 jun. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0065731>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23776537>>. Acesso em: 9 ago. 2016.

WEN, S.; MOSS, Steven F.. Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 282, n. 1, p.1-8, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.11.016>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111390>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

WU, W. K.. et al. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 295, n. 2, p.144-153, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.04.025>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488613>>. Acesso em: 10 out. 2016.

ZABALETA, Jovanny et al. Multifactorial Etiology of Gastric Cancer. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.411-435, 2012. Springer Science + Business Media. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-612-8\\_26](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-612-8_26). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22359309>>. Acesso em: 7 nov. 2015.

ZENG, H. M. et al. [The correlation between polymorphisms of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 9 and susceptibility to gastric cancer]. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi**, v. 45, n. 7, p. 588-92, Jul 2011. ISSN 0253-9624. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041559> >. Acesso em: 9 ago. 2016.

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 Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.821-

826, 1 mar. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456556>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

## ANEXOS

## ANEXO 1. PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITE 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:** Polimorfismo do gene TLR9-1486T/C e sua associação com o Helicobacter pylori, o adenocarcinoma gástrico e avaliação da expressão gênica

**Pesquisador:** Juliana Garcia de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 41357715.8.0000.5502

**Instituição Proponente:** Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 957.493

**Data da Relatoria:** 18/02/2015

**Apresentação do Projeto:**

Projeto apresentado dentro das normas estabelecidas

**Objetivo da Pesquisa:**

Este estudo tem por objetivos: a) Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TLR9 1486T/C (rs187084) nos grupos casos e controle; b) Traçar um perfil genético desses polimorfismos em associação com 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 TLR9, e possíveis associações entre os níveis de expressão gênica e as variantes polimórficas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Nada a declarar

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nada a declarar

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

**ANEXO 02. QUESTIONÁRIO DOS PROJETOS**

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

Responsáveis: Profa. Dra. 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

( ) *Helicobacterpylori*: ( ) positivo ( ) negativo

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

### ANEXO 03. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE 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 tolllike (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.
- 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 Humanada 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, o participante consente em participar do projeto de pesquisa em questão.

Bauru, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

\_\_\_\_\_  
Usuário/ responsável legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável