

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA

AGOSTINHO CALEMAN NETO

**Investigação molecular do *Helicobacter pylori* e dos genes das
Interleucinas 1 β , 8 e p53 nas afecções pépticas**

Marília

2014

Agostinho Caleman Neto

Investigação molecular do *Helicobacter pylori* e dos genes das Interleucinas 1 β , 8 e p53 nas afecções pépticas.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em "Saúde e Envelhecimento", da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: "Saúde e Envelhecimento".

Orientador: Prof^a.Dr^a. Marília de Arruda
Smith

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Trevisani
Rasmussen

Marília

2014

Agostinho Caleman Neto

Investigação molecular do *Helicobacter pylori* e dos genes das
Interleucinas 1 β , 8 e p53 nas afecções pépticas

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado Acadêmico em "Saúde e
Envelhecimento", da Faculdade de Medicina
de Marília, para obtenção do título de
Mestre. Área de concentração: "Saúde e
Envelhecimento".

Presidente da banca: Prof. Dra. Marília Arruda de Cardoso Smith

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão

Prof. Dra. Juliana Garcia de Oliveira

SUPLENTE

Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz

Prof. Dr. Wilson Baleotti Júnior

Aprovada em : ____/____/____

Dedico esse trabalho:

Primeiramente a Deus, pois sem a sua presença nada tem sentido

A minha querida esposa Caroline Arlochi Caleman por estar presente em minha vida, e me apoiar em todos os momentos e sempre acreditar em mim.

Aos meus pais Gilson Caleman e Thelma Calçada Salvetti Caleman pelo apoio, paciência e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu irmão Igor Salvetti Caleman que sempre esteve ao meu lado e meu eterno companheiro.

“Tudo posso Naquele que me fortalece.” (Paulo de Tarso).

Agradecimentos

Obrigado ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão pela confiança, oportunidade, paciência, correções, exigências constantes com que orientou este trabalho e por estar sempre pronto a ajudar e compartilhar conhecimento e experiência, obrigado por fazer parte de meu crescimento profissional e pessoal. Obrigado

Obrigado a minha segunda orientadora, Profa. Dra. Marília Arruda de Cardoso Smith, pela grande ajuda e apoio, e por fornecer amostras para nosso trabalho.

Obrigado ao meu amigo Prof. Dr. Lucas Trevisani Rasmussen, sou grato pelos conhecimentos passados, pelo apoio, pelos ensinamentos de Biologia Molecular, incentivo e confiança e companheirismo.

Obrigado ao meu amigo Roger William de Labio, agora Mestre, companheiro de laboratório e mestrado, obrigado pelos ensinamentos de técnicas de Biologia Molecular, pelo companheirismo e pela grande ajuda que me prestou nesse período da minha vida.

Obrigado a minha querida esposa Caroline, por fazer parte da minha vida, estar sempre me apoiando, me incentivando, acreditando em mim (mesmo quando até eu duvidava), me aconselhando, me acalmando principalmente durante esses últimos 2 anos de minha vida (sei que não foi fácil), enfim, obrigado pela confiança depositada em mim e o AMOR que temos um pelo outro.

Obrigado aos meus pais Gilson e Thelma pelo incentivo, apoio, carinho, suporte, obrigado pelo exemplo de vida, humanidade, amor e humildade que vocês sempre me deram, agradeço a Deus por ter colocado vocês em minha vida, amo vocês.

Obrigado ao meu irmão Igor pela vivência ao meu lado, carinho e **eterno** companheirismo. Amor de irmão é amor de irmão...

Obrigado ao Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz por sempre me ajudar nas coletas realizadas na sala de endoscopia, me incentivar e aconselhar no meu

trabalho e pela grande colaboração que tem com o grupo do Laboratório de Genética da FAMEMA.

Obrigado a todo pessoal do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Marília, Rô, Fer Miller, Fer Barbi, Dani, Cris, muito obrigado pelo apoio de todos.

Obrigado a toda equipe da Endoscopia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília, Prof. Dr. Valdeir, Dra. Rita, Dr. Eduardo, Dr. Luciano, Mara, Diva, Nilva, Márcia, Cecília, Sergião, Clarice, Talita, Silviléia.

Obrigado a todos meus colegas de mestrado da Famema pelo apoio e incentivo.

Agradeço a todos da Faculdade de Medicina de Marília pela ajuda, apoio, troca de conhecimento, atenção e acolhimento.

Obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho

Resumo

A bactéria *Helicobacter pylori* é um patógeno que coloniza o estômago humano causando gastrite crônica, úlceras pépticas e malignidades gástricas. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo relacionar os polimorfismos presentes nos genes *IL-1 β* , *IL-8* e *p53* do hospedeiro à gênese de doenças gástricas e do adenocarcinoma gástrico, em pacientes infectados por *H. pylori*. **Material e Métodos:** Foi realizada a extração de DNA de pacientes adultos com idades variando de 30 a 80 anos e de pacientes pediátricos com idades variando de 1 a 16 anos, todos com hipótese diagnóstica de gastrite crônica. Além destas, amostras de tumor e da margem adjacente ao tumor foram coletadas de 30 pacientes com adenocarcinoma. O diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* foi realizado através da técnica da PCR (Reação da Cadeia da Polimerase) utilizando oligonucleotídeos específicos. O diagnóstico positivo para *H. pylori* foi observado em 30 pacientes adultos e em 19 pediátricos. A partir das amostras positivas a genotipagem foi realizada, também utilizando oligonucleotídeos específicos, pelas técnicas da PCR-RFLP para os polimorfismos dos genes *IL-8* e *IL-1 β* e PCR em Tempo Real para o gene *p53*. **Resultados:** Houve uma diferença estatisticamente significativa quanto à presença do *H. pylori* em gastrite crônica e adenocarcinoma gástrico ($p < 0,05$). No grupo de pacientes adultos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os polimorfismos da região -511 do gene *IL1B* e a presença do *H. pylori* e também não houve diferença no gene *p53*, diferentemente da região -31, onde foi observada diferença estatística como também na região -251 do gene *IL8*. Em relação aos pacientes pediátricos, foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas no polimorfismo do gene *IL8*. Nos pacientes com adenocarcinoma gástrico, nenhuma diferença estatística foi encontrada quanto aos polimorfismos dos genes *IL8*, *IL1B* e *p53*. **Conclusão:** A presença do *H. pylori* está associada ao desenvolvimento de gastrite crônica e adenocarcinoma gástrico. Em pacientes adultos, a presença do genótipo -31TT do gene *IL1B* e do genótipo TT do gene *IL8* parecem funcionar como um fator protetor contra o *H. pylori*, diferente do genótipo TA do gene *IL8*, que parece ser um fator de risco para a presença do *H. pylori*. Em pacientes pediátricos, o genótipo AA do gene *IL8* parece ser um fator protetor contra o *H. pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, interleucina 1B, interleucina 8, câncer gástrico, gene *p53*.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a pathogen that colonizes the human stomach causing chronic gastritis, peptic ulcers and gastric malignancies. **Objective:** This study aimed to relate the polymorphisms in the *IL1B*, *IL 8* and *p53* genes in the host on the genesis of gastric disease and gastric adenocarcinoma , in patients infected by *H. pylori*. **Material and Methods:** DNA was extracted from adult patients aged 30-80 years old and pediatric patients aged 1-16 years old, all with a diagnosis of chronic gastritis. Besides these, a total of 60 samples, gastric adenocarcinoma 30 and 30 of non- neoplastic region were used for pathological analysis by means of classification. The diagnosis of infection with *H. pylori* was performed by the PCR technique (Polymerase Chain Reaction) using specific primers. The positive diagnosis of *H. pylori* was observed in 30 adult patients and pediatric 19. From the positive samples, genotyping was performed using specific primers, by the techniques of PCR - RFLP for the polymorphisms of IL - 8 and IL1B and Real-Time PCR for *p53* gene. **Results:** There were statistically significant differences in the presence of *H. pylori* in chronic gastritis and gastric adenocarcinoma ($p < 0.05$). In the group of adult patients , there was no statistically significant difference between the polymorphisms in the region -511 IL1B gene and the presence of *H. pylori* and there was no difference in the *p53* gene, unlike the -31 region , where statistical as well as the -251 region of the IL8 gene difference was observed . Regarding pediatric patients , statistically significant difference was found only in the IL8 gene polymorphism . In patients with gastric adenocarcinoma , no statistical difference was found regarding the polymorphisms of IL8 , IL1B and *p53* genes . **Conclusion:** The presence of *H. pylori* is associated with development of chronic gastritis and gastric adenocarcinoma . In adult patients , the presence of genotype - 31TT and IL1B gene TT genotype of IL8 gene appear to function as a protective factor against *H. pylori* differ from TA genotype of IL8 gene, which appears to be a risk factor for the presence of *H. pylori*. In pediatric patients , the AA genotype of IL8 gene appears to be a protective factor against *H. pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, interleukin 1B, interleukin 8, gastric cancer, *p53* gene

Sumário

1	Introdução	9
1.1	Aspectos gerais do <i>Helicobacter pylori</i>	9
1.2	Relação entre o <i>Helicobacter pylori</i> e o adenocarcinoma gástrico	10
1.3	Gene <i>p53</i>	11
1.4	Interleucina 8	12
1.5	Interleucinas 1 β	13
2	Objetivos.....	14
3	Materiais e Métodos.....	15
3.1	Amostras	15
3.2	Coleta do material de mucosa gástrica e exames	15
3.2.1	Exame Histopatológico.....	16
3.2.2	Teste Rápido da Urease.....	16
3.2.3	Extração de DNA.....	16
3.3	Diagnóstico de <i>H. pylori</i> através da técnica de PCR.....	17
3.4	Caracterizações dos polimorfismos dos genes <i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> e do gene supressor tumoral <i>p53</i>	17
3.4.1	Polimorfismos dos genes <i>IL8</i> e <i>IL1β</i>	17
3.4.3	Caracterização do polimorfismo do gene <i>p53</i> pela técnica da PCR em Tempo Real.	18
3.5	Análise Estatística	18
4	Resultados e Discussão.....	19
5	Conclusões.....	26
	Referências	27
	Anexo 1- Formulário Câncer Gástrico	36
	Anexo 2- Comitê de Ética em Pesquisa	38
	Anexo 3- Artigo enviado para publicação	39

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais do *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa que coloniza o antro e/ou o corpo do estômago humano, causando complicações gástricas como úlcera gástrica, duodenal, linfomas tipo MALT (Tecido Linfóide Associado à Mucosa) e adenocarcinoma gástrico. A bactéria apresenta de 2 a 6 flagelos de aproximadamente 3 µm de comprimento arranjados na forma unipolar ou bipolar e uma alta mobilidade atingindo rapidamente a camada mucosa que reveste o epitélio gástrico, protegendo-a da acidez e dos movimentos peristálticos. ^[1-3]

Morfologicamente, o *H. pylori* é recoberto por estruturas fibrilares circulares as quais facilitam a sua adesão às células epiteliais gástricas e dificultam sua eliminação. ^[4] A enzima urease é produzida em grande quantidade pela bactéria e converte a ureia endógena captada pelo *H. pylori* em amônia e gás carbônico, tamponando o pH e criando uma camada neutra protetora ao redor da superfície bacteriana ^[5] podendo também desestabilizar a camada de muco e causar lesões sobre as células de revestimento. ^[6]

O *H. pylori* está presente em aproximadamente metade da população mundial ^[7]. Numerosos estudos têm mostrado uma significativa correlação entre *H. pylori* e um risco de câncer gástrico distal. ^[8, 9] Os sintomas das doenças gástricas causados pelo *H. pylori* aparecem mais frequentemente em adultos, embora a aquisição desta possa ter ocorrido na infância. ^[10, 11]

De acordo com Rowland *et al.* ^[12] e Kivi ^[13], a infecção é adquirida por ingestão oral da bactéria e é principalmente transmitida entre os familiares na infância. Em países industrializados, a transmissão direta é de indivíduo para indivíduo por vômito, saliva ou fezes; além disso, a transmissão pela água contaminada pode ser importante em países em desenvolvimento. ^[14, 15]

Atherton ^[16] referiu que o desenvolvimento das doenças gástricas é influenciado pelo grau de virulência da cepa *H. pylori* infectante, a susceptibilidade genética do hospedeiro e cofatores ambientais.

O *H. pylori* apresenta um genoma de aproximadamente 1.7Mpb com 35 – 40% GC. Contém aproximadamente 1500 genes com duas cópias dos genes referentes às frações 16S, 23S e 5S rRNA. ^[3]

Muitos plasmídeos, presentes nas bactérias, carregam determinantes genéticos, os quais podem contribuir para a virulência das cepas bacterianas, como sistemas de secreção e genes responsáveis pela resistência a antibióticos. [17]

Diferente de outras bactérias, o *H. pylori* é bastante heterogêneo sob o ponto de vista genético, apresentando regiões de plasticidade em seu genoma, o que se deve a possíveis mecanismos de adaptação às condições gástricas e resposta ao sistema imune. [3, 18]

1.2 Relação entre o *Helicobacter pylori* e o adenocarcinoma gástrico

O câncer gástrico (CG) é a segunda causa mais comum de morte por câncer, apesar de que a incidência tem diminuído dramaticamente em alguns países desenvolvidos ao decorrer das décadas. [19] A carcinogênese gástrica é um processo complexo e multifatorial. [20]

O *H. pylori* tem sido amplamente identificado no CG [21] e a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde inseriu o *H.pylori* no grupo carcinogênico tipo I. [22]

Os fatores biológicos que influenciam os resultados clínicos na infecção por *H. pylori* têm sido extensivamente estudados. Além de fatores imunológicos no hospedeiro, os determinantes de virulência bacterianos em cepas de *H. pylori* apresentam um papel crucial no desenvolvimento de câncer gástrico. [21]

O CG ocorre quando as células do revestimento do estômago crescem incontrolavelmente e formam tumores que invadem o tecido normal resultando em micro metástases. A maioria de câncer gástrico é adenocarcinoma, um tipo de câncer que se desenvolve nas células da mucosa gástrica e no tecido epitelial glandular. No estágio inicial da doença é difícil detectar o tumor, pois, é assintomático, dificultando seu prognóstico antes da ocorrência de uma metástase. [23-26]

Sob o ponto de vista histológico, o adenocarcinoma gástrico é subdividido em tipo intestinal e tipo difuso. O do tipo intestinal ocorre em indivíduos mais velhos, e é mais comum do que o tipo difuso, que afeta indivíduos mais jovens com um pior prognóstico. Uma pequena porção do adenocarcinoma do tipo difuso é de origem familiar, causado por mutações no gene da *E-caderina*. [27] Estudos epidemiológicos, bem como estudos utilizando modelos animais têm indicado que o *H. pylori* tem um

papel crítico no desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal e difuso. [28]

Um estudo realizado no leste do continente asiático, região com alto risco de câncer gástrico, sugeriu que a alta taxa de marcadores de virulência do *H. pylori* como os genes *cagA*, *dupA* e alelos do *vacA* possa ser a base do alto risco de câncer de estômago na região. [29]

A idade média no diagnóstico para adenocarcinoma gástrico é de indivíduos com mais de 50 anos, por outro lado esse tipo de câncer é extremamente raro em crianças [30], compreendendo 0,05% de todo o câncer infantil. [31]

A infecção por *H. pylori* é geralmente adquirida na infância, causando ao longo do tempo uma gastrite crônica. [12, 13] O principal fator de risco para o surgimento do carcinoma é a infecção crônica, que causa uma gastrite atrófica persistente, muitas vezes com formação de úlcera péptica. As úlceras pépticas não tratadas podem degenerar devido à grande taxa de multiplicação das células da mucosa, que tentam cicatrizar a lesão, aumentando a sua taxa de mutação, podendo em longo prazo causar carcinomas gástricos. [32]

A infecção por *H. pylori* em crianças varia de 10 a 80% em diferentes populações em todo o mundo, e estima-se que por volta dos 10 anos de idade mais de 50% das crianças no mundo estejam infectadas, carregando esta ao longo da vida. A maioria dos adultos com adenocarcinoma gástrico apresentam a doença em estágio já avançado no diagnóstico. [33]

1.3 Gene *p53*

O gene *p53*, um importante gene supressor tumoral, codifica a proteína p53, que foi inicialmente isolada em 1970 com um peso molecular de 53 kDa. [34]

Um grande número de câncer em humanos mostra evidências da inativação da via p53, sugerindo que transformações malignas requerem redução ou eliminação das funções da proteína p53, tido como “guardião do genoma”. É estimado que até 50% dos cânceres humanos carreguem uma mutação no gene *p53*. [35, 36]

Localizado no cromossomo 17p13.1, este gene é suscetível à mutações somáticas, e observa-se alterações deste em até 50% dos pacientes com câncer gástrico. [37] Pelo menos 13 polimorfismos foram descritos neste gene e o mais comumente estudado é um único polimorfismo de nucleotídeo (SNP) no códon 72 do

éxon 4 do gene *p53*, o que resulta na substituição de arginina (Arg) por prolina (Pro) (rs1042522) no domínio transativacional ^[38], sendo declaradamente um fator de risco genético para câncer de estômago. ^[38-40] Entretanto, outros estudos não conseguiram confirmar esta associação. ^[41, 42]

Zaika *et al.* sugeriram que, no processo de adaptação para o ambiente favorável à sobrevivência do *H. pylori*, a bactéria tenha desenvolvido mecanismos eficazes para combater a função do gene *p53*, e sua inibição pode proporcionar vantagens para o *H. pylori* e permitir que este organismo possa alterar a homeostase celular sem provocar parada no ciclo celular ou apoptose. Como consequência, no entanto, essa alteração pode aumentar o risco de desenvolvimento de tumor. ^[43]

Em estudo realizado por Saxena, observou-se que mutação nos éxons de 5 a 8 do gene *p53* foram significativamente mais altas em pacientes com câncer gástrico quando comparadas com portadores de úlcera péptica, sendo isso independente da infecção por *H. pylori*, indicando uma associação da mutação do gene *p53* na carcinogênese gástrica. ^[44]

Meng *et al.* verificaram que em câncer gástrico e lesões teciduais pré-cancerosas foi associado uma alta taxa de infecção por *H. pylori*, levando um aumento na expressão do regulador da apoptose *p53*, junto com um aumento na expressão do inibidor *iASPP* do *p53* e uma diminuição do estimulador *ASPP2* do *p53*, indicando que a infecção por *H. pylori* possa estar envolvida na patogênese do câncer gástrico alterando o equilíbrio entre apoptose e proliferação de células gástricas. ^[45]

1.4 Interleucina 8

A interleucina 8 (IL-8) desempenha um papel importante na patogênese da infecção por *H. pylori*, sendo o mediador principal do hospedeiro que induz a quimiotaxia e ativação de neutrófilos, e é produzida por células epiteliais gástricas como uma resposta adiantada para infecção por *H. pylori*. Considera-se também que a IL-8 possa atrair e ativar os fagócitos e causar danos na mucosa, liberando radicais de oxigênio reativo. ^[46] Sugere-se que a produção de IL-8 na mucosa devido à infecção por *H. pylori* possa ser um fator importante na imunopatogênese da úlcera péptica e também pode ser relevante em carcinogêneses gástricas. ^[47]

Alguns estudos têm descrito o gene que codifica IL-8 (-251A/T) (rs4073) que está associada com um aumento na síntese de interleucinas por células epiteliais gástricas, sendo assim, associado com um risco elevado de desenvolvimento de câncer de estômago. [48-50]

Vinagre *et al* demonstraram que a interação entre o polimorfismo no gene da interleucina 8 (-251), especialmente com os portadores do alelo A e com *H. pylori* s1/m1 cagA+, desempenha uma função importante no desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico. [51]

Por outro lado, os resultados de um estudo feito por nosso grupo sugerem que o polimorfismo da IL-8 -251T>A parece não estar associado ao risco da infecção pelo *H. pylori*, porém é um polimorfismo biologicamente importante na patogênese das doenças gástricas e necessita de mais estudos em diferentes populações, já que em algumas populações esse polimorfismo parece ser fundamental no desenvolvimento das doenças gástricas. [52]

Uma meta-análise realizada com 8 estudos forneceu evidências de que o polimorfismo T/A no gene *IL8* na base -251 está associado com o aumento do risco de úlcera péptica entre asiáticos, especialmente para os subgrupos *H. pylori* +, úlcera duodenal e úlcera gástrica. [53]

1.5 Interleucinas 1 β

A interleucina 1 β (IL1 β), uma potente citocina pró-inflamatória e inibidora da secreção de ácido gástrico, é regulada na presença de *H. pylori* e é importante para a iniciação e amplificação da resposta inflamatória para esta infecção. [54, 55]

Em estudos anteriores, polimorfismos do gene *IL1 β* , que codifica a IL-1 β tem sido associado com um aumento do risco de carcinoma gástrico. [56, 57] Dois polimorfismos em *IL-1 β* têm sido relatados, cada um representando transições da base C por T em posições -511(rs16944) e -31(rs1143634), sendo associados com desenvolvimento de câncer gástrico e seus precursores. [58-60]

2 Objetivos

- 1) Diagnosticar a infecção pelo *Helicobacter pylori*, através da técnica de PCR e do Teste Rápido da Urease, correlacionando com os resultados histológicos;
- 2) Avaliar as frequências genótípicas dos polimorfismos do gene *IL1 β* , *IL8* e *p53* por meio da técnica de PCR-RFLP/ Real Time em amostras de pacientes com gastrite e adenocarcinoma gástrico infectados por *H. pylori*.

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras

Um total de 109 pacientes que passaram pelo procedimento endoscópico participaram do estudo. 60 pacientes com idades variando de 30 a 80 anos ($52,1 \pm 10,17$) e 49 pacientes com idades variando de 1 a 16 anos ($8,77 \pm 4,01$), todos com hipótese diagnóstica de gastrite crônica e atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília. Além destas, amostras de tumor e da margem adjacente ao tumor foram coletadas de 30 pacientes com adenocarcinoma gástrico atendidos uma parte na Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) em São Paulo e outra parte no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) em Belém-PA e foram utilizadas para análise por meio da classificação patológica (Sydney). Todos os pacientes com adenocarcinoma gástrico foram submetidos a questionário específico conforme destacado no **anexo 1**. O diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* foi realizado através da técnica da PCR utilizando oligonucleotídeos específicos.

Todos os pacientes com hipótese diagnóstica de doenças pépticas ou seus respectivos responsáveis receberam orientações quanto aos objetivos e protocolo da pesquisa e o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Famema, Marília/SP, (protocolo nº. 1119/11-**anexo 2**).

3.2 Coleta do material de mucosa gástrica e exames

O exame endoscópico foi realizado nos pacientes após terem feito jejum de 8 horas. Em pacientes menores de 10 anos o exame se realizou sob sedação anestésica com supervisão de médico anesthesiologista. Em pacientes com idade superior a 10 anos a sedação foi endovenosa com meperidina associada a midazolam. Todos os pacientes receberam dimeticona via oral e anestesia tópica do orofaringe com lidocaína por vaporização.

O exame foi realizado por videoendoscópio da marca Plympus (GIF-150), que permitiu definir o diagnóstico endoscópico para análise. Foram retirados fragmentos para exame histopatológico, exame da urease e extração de ácidos nucléicos. Todos os exames foram realizados por um único endoscopista e acompanhado pelo autor.

Em relação à coleta das amostras de adenocarcinoma gástrico, após a ressecção do estômago, o patologista abriu a peça e localizou o tumor, definindo área tumoral e margem não-neoplásica. Utilizando-se de pinça e bisturi estéreis, um pedaço de tecido tumoral foi retirado e imediatamente colocado em criotubo estéril e em nitrogênio líquido. O mesmo procedimento foi realizado para a margem não-neoplásica, a qual também foi realizada no estudo.

3.2.1 Exame Histopatológico

As biópsias para exame histopatológico foram colocadas em papel filtro, fixadas em solução de formol a 10% e encaminhadas ao Laboratório de Patologia da Famema (Faculdade de Medicina de Marília), sendo submetidas ao processo histológico com inclusão em parafina, de acordo com técnicas habituais, coradas pelos métodos hematoxilina-eosina e Giemsa. O exame microscópico serviu para definir o grau de comprometimento da mucosa gástrica.

3.2.2 Teste Rápido da Urease

O teste rápido da urease foi realizado imediatamente após a coleta do material, conforme protocolo estabelecido pelo Kit *TUPF teste de urease* pré-formada (Laborclin, 900347), no qual é colocado o fragmento de mucosa do antro gástrico em meio líquido contido em tubos de plástico específicos contendo 1 mL de solução com agente tamponante, ureia e indicador de pH. A leitura foi realizada 24 horas após o exame. O teste baseia-se na mudança de um indicador em razão da alteração do pH. Havendo a colonização do fragmento pelo *Helicobacter pylori*, a urease por ele produzida hidrolisa a ureia do meio, originando amônia e bicarbonato, aumentando o pH do meio com consequente alteração do indicador e mudança da cor da solução de amarelo palha para rosa púrpura, o que caracteriza o resultado positivo do teste.

3.2.3 Extração de DNA

A extração do DNA genômico a partir das amostras de biópsias gástricas foi realizada conforme protocolo estabelecido pelo fabricante do kit QIAamp DNA Mini kit[®] - cat. no. 51306 (QIAGEN, 40724 Hilden Germany). A extração do DNA ocorre

em 3 fases, utilizando uma coluna de troca iônica apropriada para ligação e purificação do DNA. O passo inicial consiste na lise das células, e em seguida o lisado é precipitado e colocado em contato com a coluna para a sua adsorção. Posteriormente são realizadas lavagens da coluna contendo DNA com soluções descontaminantes e o DNA é eluído e ressuspendido em 200 µl de uma solução tampão denominada AE (kit descrito acima).

3.3 Diagnóstico de *H. pylori* através da técnica de PCR

Para a detecção de *H. pylori* através da técnica da PCR, foi utilizado um par de oligonucleotídeos HP1 1/HPX2 ^[61], o qual amplifica um fragmento de 150pb referente a uma fração do rRNA 16S do *H. pylori*.

As condições para a reação da PCR foram 40 ciclos de amplificação, onde cada ciclo consiste de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de associação a 59°C e 45 segundos de extensão a 72°C.

3.4 Caracterizações dos polimorfismos dos genes *IL-1β*, *IL-8* e do gene supressor tumoral *p53*

Esta técnica consiste na realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do fragmento específico a ser estudado. Após a amplificação e análise por eletroforese em gel de agarose os produtos da PCR foram submetidos a um tratamento com endonucleases de restrição que atuam na clivagem de sítios específicos gerando fragmentos de diferentes tamanhos possibilitando assim a caracterização de seus polimorfismos. A análise dos fragmentos gerados pela clivagem foi feita através da técnica de Eletroforese em gel de agarose para caracterização do genótipo.

3.4.1 Polimorfismos dos genes *IL8* e *IL1β*

A caracterização dos genótipos dos genes *IL1β* e *IL8* foi realizada através da técnica de PCR – RFLP, que já se encontra padronizada no nosso laboratório, conforme descrita nos artigos científicos publicados previamente pelo nosso grupo.

[62, 63]

Os oligonucleotídeos utilizados para o gene *IL-8* na base -251 foram F1/R2 [64] e para *IL-1 β* os oligonucleotídeos 511S/511A na base -511 e -31S/-31A na base -31. [41]

3.4.3 Caracterização do polimorfismo do gene p53 pela técnica da PCR em Tempo Real.

Para a caracterização do polimorfismo do códon 72 do gene supressor tumoral *p53* foi utilizada a técnica da PCR em Tempo Real que se baseia na utilização de oligonucleotídeos e sondas específicas. Utilizando esta técnica foi possível realizar a identificação do polimorfismo com precisão devido à constituição destas sondas que são específicas e possuem marcadores fluorescentes distintos para cada nucleotídeo envolvido. Foi utilizado o ensaio TaqMan® SNP Genotyping Assay inventariado da empresa Applied Biosystems, pois, os ensaios inventariados são desenhados e testados pela empresa.

3.5 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística foram usados os testes Fisher e Qui-quadrado pelo programa SPSS (PASW STATISTICS 18).

4 Resultados e Discussão

No grupo de pacientes adultos, o *H. pylori* foi detectado em 30/60 pacientes (50%) por PCR, sendo os outros 30 identificados como controle negativo. Dos 60 pacientes, 46 (76,7%) foram diagnosticados com gastrite crônica por meio da análise histopatológica. Destes, o *H. pylori* foi detectado em 30 (65,2%) por PCR e o teste rápido da urease detectou a presença do *H. pylori* em apenas 21 (35%) pacientes sugerindo uma relação entre a presença do *H. pylori* e o desenvolvimento de gastrite crônica. (quadro 1)

		Gastrite		
		Não	Sim	Total
PCR	Positivo	0	30	30
	Negativo	14	16	30
*p=0.001				
		Urease		
		Não	Sim	Total
Urease	Positivo	1	20	21
	Negativo	13	26	39
*p=0.003				

Quadro 1: Detecção da presença do *H. pylori* pelo exame da PCR e Teste Rápido da Urease em pacientes adultos com gastrite.

Os polimorfismos da região -511 do gene *IL1B* em relação à presença da bactéria não apresentaram diferenças significativas comparado ao grupo controle. (quadro 2)

IL1β-511				
PCR	TT(%)	TC(%)	CC(%)	Total
Negativo	4(13,3)	16(53,3)	10(33,3)	30
Positivo	6(20)	13(43,3)	11(36,7)	30

Quadro 2: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -511 do gene *IL1β* em pacientes adultos.

Quando feita a análise dos polimorfismos da região -31 do gene *IL1B*, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao genótipo TT comparando-se grupo positivo e grupo controle. Tal genótipo teve a presença diminuída em pacientes *H. pylori* + ($p=0,01^*$), sugerindo que este genótipo possa funcionar como um fator protetor contra a infecção bacteriana (quadro 3).

IL β 1-31				
PCR	CC(%)	TC(%)	*TT(%)	Total
Negativo	5(16,7)	15(50)	10(33,3)	30
Positivo	9(30)	18(60)	2(6,7)	30

Quadro 3: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -31 do gene *IL1 β* em pacientes adultos.
* $p<0.05$

Os genótipo TA e TT do gene *IL8* também apresentaram uma diferença significativa comparando-se os 2 grupos. A presença do genótipo TA esteve aumentada em pacientes *H. pylori*+ em relação a pacientes *H. pylori*- ($p=0,039^*$), sugerindo que a presença do genótipo TA possa ser um fator de risco para a infecção pela bactéria. Por outro lado, a presença do genótipo TT do gene *IL8* esteve diminuída em pacientes *H. pylori*+ em relação a pacientes *H. pylori*- ($p=0,047$), sugerindo que a presença do genótipo TT possa ser um fator protetor contra a infecção por *H. pylori* (quadro 4).

PCR	IL8-251			Total
	AA(%)	*TA(%)	*TT(%)	
Negativo	6(20)	11(36,7)	13(43,3)	30
Positivo	5(16,7)	19(63,3)	6(20)	30

Quadro 4: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -251 do gene *IL8* em pacientes adultos
* $p<0.05$

O polimorfismo do gene p53 (códon 72) também não apresentou diferença significativa em relação ao *H. pylori*.(Quadro 5)

PCR	p53 (códon 72)			Total
	CC(%)	CG(%)	GG(%)	
Negativo	14(46,7)	13(43,3)	3(10)	30
Positivo	14(46,7)	12(40)	4(13,3)	30

Quadro 5: Distribuição dos genótipos do códon 72 do gene p53 em pacientes adultos.

No grupo de pacientes pediátricos, o *H. pylori* foi detectado em 19/49 pacientes (38,8%) por PCR, sendo os outros 30 identificados como controle negativo. Dos 49 pacientes, 24 (76,9%) foram diagnosticados com gastrite crônica por meio da análise histopatológica e o teste rápido da urease detectou a presença de *H. pylori* em apenas 20 (40,8%) pacientes, mostrando uma sensibilidade de 56,5% e especificidade de 73,1% do teste da urease ($p=0,045$) e uma sensibilidade de 60,9% e especificidade de 80,8% do PCR ($p=0,03$) sugerindo uma relação entre a presença do *H. pylori* e o aparecimento de gastrite crônica.(quadro 6)

PCR	Gastrite		Total
	Não	Sim	
Positivo	3	16	19
Negativo	21	9	30
*p=0.003			
Urease	Gastrite		Total
	Não	Sim	
Positivo	7	13	20
Negativo	19	10	29
*p=0.045			

Quadro 6: Detecção da presença do *H. pylori* pelo exame da PCR e Teste Rápido da Urease em pacientes pediátricos com gastrite.

Os polimorfismos dos genes *IL1B* (regiões -511 e -31) não apresentaram diferença estatística em relação à presença do *H. pylori*, assim como o gene *p53* (códon 72).(quadros 7, 8 e 9)

PCR	IL1 β -511			Total
	CC	TC	TT	
Negativo	13(43,3)	13(43,3)	5(16,7)	30
Positivo	9(47,4)	10(52,6)	2(10,5)	19

Quadro 7: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -511 do gene *IL1 β* em pacientes pediátricos.

PCR	IL1 β -31			Total
	CC	TC	TT	
Negativo	6(20)	14(46,7)	10(33,3)	30
Positivo	4(21,1)	13(68,4)	2(10,5)	19

Quadro 8: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -31 do gene *IL1 β* em pacientes pediátricos.

PCR	P53 (códon 72)			Total
	CC	CG	GG	
Negativo	15(50)	12(40)	3(10)	30
Positivo	10(52,6)	6(31,6)	3(15,8)	19

Quadro 9: Distribuição dos genótipos do códon 72 gene *p53* em pacientes pediátricos.

Diferentemente, o gene *IL8* (região -251) apresentou uma diferença estatística em relação ao genótipo AA com a presença do *H. pylori* ($p=0.047$), sugerindo um efeito protetor contra a infecção pelo *H. pylori*. (quadro 10)

PCR	<i>IL8-251</i>			Total
	*AA(%)	TA(%)	TT(%)	
Negativo	12(40)	11(36,7)	7(23,3)	30
Positivo	3(15,8)	7(36,8)	9(47,4)	19

Quadro 10: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -251 do gene *IL8* em pacientes pediátricos.

* $p<0.05$

Em relação aos pacientes com adenocarcinoma gástrico, o *H. pylori* foi detectado em 73,3% na região tumoral e na margem não-tumoral comparado à ausência da bactéria que foi de 26,7% também nas duas regiões ($p>0,05$) (quadro 11).

<u>Histologia</u>	<i>H. pylori</i>		Total
	Positivo(%)	Negativo(%)	
Tumor	22(73,3)	8(26,7)	30
* $p=0.003$ Margem	22(73,3)	8(26,7)	30

Quadro 11: Frequência do *H. pylori* na região tumoral e margem não tumoral em pacientes com adenocarcinoma gástrico. * $p<0.05$

Quanto à caracterização dos polimorfismos dos genes *IL1B* (-31 e -511), *IL8* e *p53*, não houve nenhuma diferença estatística entre os genótipos e a infecção pelo *H. pylori* (quadros 12, 13,14 e 15).

Histologia	<i>IL 1B -31</i>			Total
	CC(%)	TC(%)	TT(%)	
Adenocarcinoma Gástrico	12(40)	12(40)	6(20)	30

Quadro 12: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -31 do gene *IL1B* em pacientes com adenocarcinoma gástrico. $p>0.05$

Histologia	IL 1B -511			Total
	CC(%)	TC(%)	TT(%)	
Adenocarcinoma Gástrico	8(26,7)	14(46,6)	8(26,7)	30

Quadro 13: Distribuição dos genótipos da região promotora na base -511 do gene *IL1B* em pacientes com adenocarcinoma gástrico. $p>0.05$

Histologia	IL 8-251			Total
	AA(%)	TA(%)	TT(%)	
Adenocarcinoma Gástrico	4(13,3)	16(53,4)	10(33,3)	30

Quadro 14: Distribuição dos genótipos da região -251 do gene *IL8* em pacientes com adenocarcinoma gástrico. $p>0.05$

Histologia	p53			Total
	CC(%)	CG(%)	GG(%)	
Adenocarcinoma Gástrico	14(46,7)	13(43,3)	3(10)	30

Quadro 15: Distribuição dos genótipos do gene *p53* em pacientes com adenocarcinoma gástrico. $p>0.05$

O complexo papel das interleucinas nas respostas inflamatórias causadas pela infecção pelo *H. pylori* é muito importante para o entendimento dos distúrbios gástricos.

El-Omar *et al.* [56] verificaram uma associação de genótipos da *IL1β* com uma baixa taxa de ácido clorídrico em pacientes com câncer. Eles sugerem que indivíduos com genótipo -31TT ou TC e -511TT ou TC possuem uma expressão elevada do gene *IL1β* em resposta à infecção pelo *H. pylori*, levando a um aumento na inflamação e uma diminuição no componente ácido no estômago. Outro estudo feito por japoneses mostrou que a presença do genótipo -31TT apresenta um risco maior para a infecção por *H. pylori* e adenocarcinoma gástrico [65]. Estes resultados contradizem nossos achados em relação ao genótipo -31TT, quando sugerido como um fator protetor em pacientes adultos com gastrite crônica infectados por *H. pylori*.

Talvez em pacientes pediátricos e com adenocarcinoma não foi possível observar tais aspectos devido ao número amostral de nosso estudo e área geográfica estudada.

Além da interleucina 1B, polimorfismos da IL8 também têm sido estudados como um possível fator que influencia o desenvolvimento de afecções gástricas [53]. Alguns estudos têm mostrado uma associação entre polimorfismos da *IL8* (-251) e um aumento no risco de desenvolvimento de doenças gastroduodenais [53, 66].

Vinagre *et al.* [67] mostraram uma elevada frequência nos genótipos TA e AA do gene *IL8* entre pacientes com adenocarcinoma gástrico e grupo controle. Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado que pacientes que carregam o alelo A apresentam uma maior produção de IL8, levando a alterações na qualidade e na intensidade de resposta inflamatória produzidas pelo hospedeiro após ser exposto ao *H. pylori* [50]. Song *et al.* também mostraram que o genótipo AA possa estar associado com a angiogênese na carcinogênese gástrica em pacientes coreanos infectados por *H. pylori*. Nossos resultados foram iguais quando observamos a presença de gastrite crônica em pacientes pediátricos infectados com a bactéria, em relação ao genótipo AA, embora não apresentaram nenhuma similaridade em pacientes com adenocarcinoma gástrico e pacientes adultos com gastrite crônica.

Hofner *et al.* [68], descreveram resultados que mostram uma associação entre o genótipo heterozigoto do gene *IL8* (TA) e risco de gastrites ou úlceras duodenais em pacientes infectados pelo *H. pylori*. Tais resultados vão de encontro com os nossos, quando observamos que o genótipo TA possa ser um fator de risco para a infecção pela bactéria, em pacientes com gastrite.

Talvez o número de amostras por nós utilizado possa ter influenciado em alguns resultados dos polimorfismos das interleucinas, portanto, como esses polimorfismos são biologicamente importantes para o desenvolvimento de doenças gástricas, é necessário mais estudos com um maior número amostral para uma melhor elucidação e também a análise das expressões desses genes para uma melhor compreensão do que se passa no decorrer das doenças.

5. Conclusões

1. Em pacientes adultos e pediátricos houve uma diferença estatisticamente significativa em relação à presença do *H. pylori* detectado por PCR e também pelo Teste rápido da Urease em pacientes com gastrite crônica.
2. Em relação ao polimorfismo da IL1B houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o genótipo -31TT em pacientes infectados por *H. pylori*, funcionando como um fator protetor contra o *H. pylori* em pacientes adultos infectados. Por outro lado, isto não foi observado em pacientes pediátricos. Verificamos também que não houve diferença estatisticamente significativa à caracterização dos genótipos da região -511. Quando observado os polimorfismos da IL8, verificamos que o genótipo TA possa funcionar como um fator de risco para o *H. pylori* e que o genótipo TT possa funcionar como um fator protetor contra a bactéria em pacientes adultos. Por outro lado, o genótipo AA pareceu funcionar como um fator protetor contra a bactéria em pacientes pediátricos. Em relação aos polimorfismos do gene p53, nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa. No grupo de pacientes com adenocarcinoma gástrico, houve diferença estatisticamente significativa comparando-se a presença do *H. pylori* no tumor, onde esteve aumentada, em relação à margem não-neoplásica. Quando analisamos os polimorfismos dos genes IL1 β , IL8 e p53 não verificamos nenhuma diferença estatística presente.

Referências

1. Warren R, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983;1(8336):1273-5.
2. Blaser MJ. Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(4):759-62.
3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(3):449-90.
4. Smoot DT, Resau JH, Naab T, Desbordes BC, Gilliam T, Bull-Henry K, et al. Adherence of *Helicobacter pylori* to cultured human gastric epithelial cells. *Infection and immunity*. 1993;61(1):350-5.
5. Marshall BJ, Langton SR. Urea hydrolysis in patients with *Campylobacter pyloridis* infection. *Lancet*. 1986;1(8487):965-6.
6. Hu LT, Mobley HL. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. 1990;58(4):992-8.
7. Mitchell HM. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Current topics in microbiology and immunology*. 1999;241:11-30.
8. Kignel S, de Almeida Pina F, Andre EA, Alves Mayer MP, Birman EG. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral diseases*. 2005;11(1):17-21.
9. De Vries AC, Kuipers EJ. Review article: *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;26 Suppl 2:25-35.

10. Bonamico M, Mariani P, Magliocca FM, Petrozza V, Montuori M, Pezzella C, et al. *Helicobacter pylori* duodenal colonization in children. *Acta Paediatr.* 1997;86(4):356-60.
11. Lehours P, Yilmaz O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2007;12 Suppl 1:1-3.
12. Rowland M, Kumar D, Daly L, O'Connor P, Vaughan D, Drumm B. Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. *Gastroenterology.* 1999;117(2):336-41.
13. Kivi M, Rodin S, Kupersmidt I, Lundin A, Tindberg Y, Granstrom M, et al. *Helicobacter pylori* genome variability in a framework of familial transmission. *BMC microbiology.* 2007;7:54.
14. Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 1999;282(23):2240-5.
15. Delport W, van der Merwe SW. The transmission of *Helicobacter pylori*: the effects of analysis method and study population on inference. *Best practice & research Clinical gastroenterology.* 2007;21(2):215-36.
16. Atherton JC. *H. pylori* virulence factors. *British medical bulletin.* 1998;54(1):105-20.
17. Hofler C, Fischer W, Hofreuter D, Haas R. Cryptic plasmids in *Helicobacter pylori*: putative functions in conjugative transfer and microcin production. *International journal of medical microbiology : IJMM.* 2004;294(2-3):141-8.
18. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology.* 2009;136(6):1863-73.
19. Garcia CC, Benavides CC, Apablaza SP, Rubilar PO, Covacevich SR, Penaloza PM, et al. [Surgical treatment of gastric cancer: results in 423 cases].

Revista medica de Chile. 2007;135(6):687-95 Resultados del tratamiento quirurgico del cancer gastrico: Analisis de 423 casos.

20. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer research*. 1992;52(24):6735-40.

21. Shimoyama T, Crabtree JE. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1998;43 Suppl 1:S2-5.

22. IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 1994;61:1-241.

23. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. H pylori and host interactions that influence pathogenesis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006;12(35):5599-605.

24. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(7):2274-9.

25. Akhter Y, Ahmed I, Devi SM, Ahmed N. The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. *Infectious agents and cancer*. 2007;2:2.

26. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(5):611-20.

27. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998;392(6674):402-5.
28. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *The New England journal of medicine*. 2001;345(11):784-9.
29. Wang MY, Chen C, Gao XZ, Li J, Yue J, Ling F, et al. Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in a region at high risk of gastric cancer. *Microbial pathogenesis*. 2013;59-60:13-8.
30. Subbiah V, Varadhachary G, Herzog CE, Huh WW. Gastric adenocarcinoma in children and adolescents. *Pediatric blood & cancer*. 2011;57(3):524-7.
31. Harting MT, Blakely ML, Herzog CE, Lally KP, Ajani JA, Andrassy RJ. Treatment issues in pediatric gastric adenocarcinoma. *Journal of pediatric surgery*. 2004;39(8):e8-10.
32. Peek RM, Jr., Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(1):28-37.
33. Varadhachary G, Ajani JA. Gastric cancer. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*. 2005;3(2):118-24.
34. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-3.
35. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
36. Brachmann RK. p53 mutants: the achilles' heel of human cancers? *Cell Cycle*. 2004;3(8):1030-4.

37. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-31.
38. Shepherd T, Tolbert D, Benedetti J, Macdonald J, Stemmermann G, Wiest J, et al. Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology*. 2000;118(6):1039-44.
39. Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene*. 1988;70(2):245-52.
40. Zhang ZW, Newcomb P, Hollowood A, Feakins R, Moorghen M, Storey A, et al. Age-associated increase of codon 72 Arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(6):2151-6.
41. Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Kozaki K, Takahashi T, Tajima K. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 2000;91(9):865-8.
42. Khayat AS, Lobo Gatti L, Moura Lima E, de Assumpcao PP, Nascimento Motta FJ, Harada ML, et al. Polymorphisms of the TP53 codon 72 and WRN codon 1367 in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Clinical and experimental medicine*. 2005;5(4):161-8.
43. Zaika A, Wei J, Noto J, Peek R, Jr. Regulation of the p53 by *Helicobacter pylori*. *Oncotarget*. 2012;3(10):1057-8.
44. Saxena A, Shukla SK, Prasad KN, Ghoshal UC. Analysis of p53, K-ras gene mutation & *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric cancer & peptic ulcer disease at a tertiary care hospital in north India. *The Indian journal of medical research*. 2012;136(4):664-70.

45. Meng WD, Chu RX, Wang BZ, Wang LP, Ma LL, Wang LX. Helicobacter pylori infection and expressions of apoptosis-related proteins p53, ASPP2 and iASPP in gastric cancer and precancerous lesions. *Pathologie-biologie*. 2013.
46. Zhang QB, Dawodu JB, Husain A, Etohi G, Gemmell CG, Russell RI. Association of antral mucosal levels of interleukin 8 and reactive oxygen radicals in patients infected with Helicobacter pylori. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92(1):69-73.
47. Crabtree JE, Lindley IJ. Mucosal interleukin-8 and Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 1994;6 Suppl 1:S33-8.
48. Ohyauchi M, Imatani A, Yonechi M, Asano N, Miura A, Iijima K, et al. The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. *Gut*. 2005;54(3):330-5.
49. Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, et al. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(11 Pt 1):2487-93.
50. Ye BD, Kim SG, Park JH, Kim JS, Jung HC, Song IS. The interleukin-8-251 A allele is associated with increased risk of noncardia gastric adenocarcinoma in Helicobacter pylori-infected Koreans. *Journal of clinical gastroenterology*. 2009;43(3):233-9.
51. Vinagre RM, Corvelo TC, Arnaud VC, Leite AC, Barile KA, Martins LC. Determination of strains of Helicobacter pylori and of polymorphism in the interleukin-8 gene in patients with stomach cancer. *Arquivos de gastroenterologia*. 2011;48(1):46-51.

52. Fabris RC, Rasmussen LT, Neto AC, de Labio, R.W, Orcini W, et al. Interleukin-8 -251T>A polymorphism and Helicobacter pylori. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. 2011;40(3):25-9.
53. Yin YW, Hu AM, Sun QQ, Zhang BB, Wang Q, Liu HL, et al. Association between interleukin-8 gene -251 T/A polymorphism and the risk of peptic ulcer disease: a meta-analysis. *Human immunology*. 2013;74(1):125-30.
54. Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with Helicobacter pylori infection. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1994;29(5):425-9.
55. Basso D, Scrigner M, Toma A, Navaglia F, Di Mario F, Rugge M, et al. Helicobacter pylori infection enhances mucosal interleukin-1 beta, interleukin-6, and the soluble receptor of interleukin-2. *International journal of clinical & laboratory research*. 1996;26(3):207-10.
56. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000;404(6776):398-402.
57. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, et al. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*. 2001;121(4):823-9.
58. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*. 2002;123(1):92-105.
59. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in Helicobacter pylori associated disease. *Gut*. 2001;48(6):743-7.

60. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(22):1680-7.
61. Scholte GH, van Doorn LJ, Quint WG, Lindeman J. Polymerase chain reaction for the detection of Helicobacter pylori in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 1997;6(4):238-43.
62. Gatti LL, Burbano RR, de Assumpção PP, Smith MAC, Payao SLM. Interleukin-1beta polymorphisms, Helicobacter pylori infection in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *clinical and experimental medicine*. 2004;4:5.
63. Fabris RCR, L. T; Caleman Neto, A; de Labio, R. W; Orcini, W; Ximenez, J. P. B; Franzolin, S; Payao, S. L. M. Interleukin-8 -251T>A polymorphism and Helicobacter pylori. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. 2012;40(3):5.
64. Hamajima N. Persistent Helicobacter pylori infection and genetic polymorphisms of the host. *Nagoya journal of medical science*. 2003;66(3-4):103-17.
65. Hamajima N, Matsuo k, Saito T, Tajima K, Okuma K, Yamao K, et al. Interleukin 1 polymorphisms, lifestyle factors, and Helicobacter pylori infection. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92:6.
66. Song JH, Kim SG, Jung SA, Lee MK, Jung HC, Song IS. The interleukin-8-251 AA genotype is associated with angiogenesis in gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected Koreans. *Cytokine*. 2010;51(2):158-65.
67. Vinagre RM, Corvelo TC, Arnaud VC, Leite AC, Barile KA, Martins LC. Determination of strains of Helicobacter pylori and of polymorphism in the interleukin-8 gene in patients with stomach cancer. *Arquivos de gastroenterologia*. 2011;48(1):46-51. *Arquivos de gastroenterologia*. 2011;48:5.

68. Hofner P, Gyulai Z, Kiss ZF, Tiszai A, Tiszlavicz L, Toth G, et al. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter*. 2007;12(2):124-31.

Anexo 1- Formulário Câncer Gástrico

Aspectos Genéticos do Câncer Gástrico

PRONTUÁRIO

Nome do Paciente: _____

Telefone para Contato: _____

Registro Hospitalar do Paciente: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Gênero: Masculino Feminino

Tipo Sanguíneo: TipoA Negativo

TipoB Positivo

TipoAB

TipoO

Anemia: Positivo Negativo

Valor de Hb: _____

Terapia antes da cirurgia: Sim Não

Qual? _____

Lesão Precursora: Gastrite *H. pylori*

Úlcera

Metaplasia

Pólipos

Local do adenocarcinoma: _____

PACIENTE

Estado Civil: Solteiro Casado Separado/Divorciado Viúvo

Ocupação: _____

Naturalidade: Cidade: _____ Estado: _____

Endereço atual: Cidade: _____ Estado: _____

Etnia: Amarelo Branco Pardo Negro

Tabagismo: Sim Parou Nunca fumou

Frequência (cigarros/dia): _____

Há quanto tempo parou de fumar? _____

Consumo de bebidas alcoólicas: Sim Não Raramente Nunca usou

Qual? _____

Frequência (doses/semana) _____

Obesidade: Sim Não

Consumo de frutas e/ou vegetais frescos: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Consumo de alimentos enlatados: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Consumo de alimentos/bebidas quentes: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Consumo de alimentos conservados em sal: Sim Não

Frequência (vezes/semana): _____

Medicamentos (uso regular): _____

Há quantos anos: _____

Presença de outros tipos de câncer: Positivo Negativo

Qual? _____

Quando? _____

Histórico de câncer na família: Positivo Negativo

Qual o câncer? _____

Grau de parentesco: _____

Heredograma:

Responsável: _____

Data: ____/____/____

Anexo 2- Comitê de Ética em Pesquisa



SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO,
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Marília, 15 de Dezembro de 2011

Ilmo Sr.
Prof. Dr Spencer Luiz Marques Payão
Marília/SP


O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, recebeu o protocolo de estudo nº 1119/11, intitulado: "Investigação Molecular do Helicobacter Pylori e dos Genes das Interleucinas 1 β , 1RN 8 e p53 nas Doenças Pépticas: Uma Possível Relação com o Envelhecimento", foi considerado **APROVADO "Ad Referendum"** após responder a pendência apontada em Reunião Ordinária – 24/10/2011, aceito de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, aguardar parecer da CONEP para ser iniciado.

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Carlos F. Braga
Vice-Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

Anexo 3- Artigo enviado para publicação



**Journal of
Venomous Animals and Toxins
including Tropical Diseases**

IMPACT
FACTOR
0.55

Search for

[Advanced search](#)

Home Articles Authors Reviewers About this journal My JVATITD

My details

My email preferences

My manuscripts

My subscription

Email preferences and manuscript information for other BioMed Central journals can be viewed on the [BioMed Central](#) site.

For queries, contact our [customer services](#)

My manuscripts

▼ As an author

▼ Submitted manuscripts

Interleukin 1 and 8 Genes Polymorphisms in Chronic Gastritis Patients Infected by Helicobacter pylori

Journal: **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**

Manuscript ID: 3765067311712799

Submitted: 7 January 2014

Peer review status: Revision requested ⓘ

Due by: 15 January 2014