



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

GABRIELA ALMEIDA DE OLIVEIRA ESTEVES

POLIMORFISMOS DE CITOCINAS (*TNF- $\alpha$* , *IL-10* E *IL-17*) NO CÂNCER GÁSTRICO

Belém-PA  
2016

GABRIELA ALMEIDA DE OLIVEIRA ESTEVES

POLIMORFISMOS DE CITOCINAS (*TNF-A*, *IL-10* E *IL-17*) NO CÂNCER GÁSTRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ândrea Ribeiro dos Santos.

Área de concentração: Medicina I

Belém-PA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

De Oliveira, Gabriela Almeida, 1986-  
- Polimorfismos de citocinas (tnf-a, il-10 e il-17) no  
câncer gástrico. / Gabriela Almeida De Oliveira. - 2016.

Orientadora: ândrea Ribeiro dos Santos.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em  
Oncologia, Programa de Pós-Graduação em  
Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2016.

1. Neoplasias Gástricas. 2. Polimorfismo  
Genético. 3. Citocinas. I. Título.

CDD 23. ed. 616.99433098115

---

GABRIELA ALMEIDA DE OLIVEIRA ESTEVES

POLIMORFISMOS DE CITOCINAS (*TNF-A*, *IL-10* E *IL-17*) NO CÂNCER GÁSTRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ândrea Ribeiro dos Santos.

Área de concentração: Medicina I

Aprovado em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Paulo Pimentel Assumpção – Universidade Federal do Pará  
Orientadora

---

Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> – Universidade Federal do Pará  
Membro da Banca

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maristela Gomes da Cunha – Universidade Federal do Pará  
Membro da Banca

---

Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> André Salim Khayat – Universidade Federal do Pará  
Membro da Banca

Belém-PA  
2016

*Aos meus quatro corações, pai, mãe, irmão e marido.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Emília e Antonino, pelo amor incondicional, apoio, carinho, esforço e dedicação, cruciais em cada vitória alcançada por mim. Amo vocês.

Ao meu irmão Junior, amigo, grande incentivador e mais orgulhoso irmão do mundo, melhor pessoa que conheço. Obrigada, você é parte de mim.

Ao meu marido e amigo Rafael, obrigada por querer dividir comigo essa jornada, obrigada por tantos anos de apoio e amor diários, “você me faz querer ser uma pessoa melhor”.

À minha sogra Susy, grande incentivadora dessa conquista, amiga e mãe.

Às minhas cunhadas e irmãs Lorena e Vanessa, pelo amor, amizade, incentivo, obrigada por tornarem a vida mais leve. Amo vocês.

À Marianne, que antes de tudo isso acontecer, me orientou e foi fundamental para minha aprovação, obrigada pela ajuda. Não vou esquecer jamais.

Aos amigos Darlen e Pablo, essa conquista não seria possível sem os ensinamentos e ajuda de vocês, recebam todo meu respeito e admiração. Muito obrigada.

Aos amigos Roberta e Antônio, por compartilharem conhecimento, pelo trabalho conjunto, pelas risadas, amizade, apoio e incentivo. Muito obrigada.

Ao amigo Esdras, 513 candidatos concorrendo à 20 vagas, mal sabia eu que ganharia além da aprovação, um amigo incrivelmente inteligente, íntegro e especial. Obrigada por acreditar em mim e sempre me incentivar.

À amiga Camile, obrigada pelos conselhos, ajuda, conhecimento, amizade genuína, tens meu respeito e admiração pela pessoa inteligente e correta que és. Obrigada.

Aos demais amigos, Leandro, Amanda, Giovanna, André, Iguaracy, Aline e Tatiana, obrigada pela amizade, pelas risadas, conhecimento compartilhado, “imagem e ação”, reuniões, viagens, que felicidade ter vocês na minha vida. Levarei sempre comigo.

À minha Orientadora, professora Dra. Ândrea Ribeiro, que tornou possível todas as coisas boas que me aconteceram nesses dois anos, no instante em que me aceitou como aluna. Sou grata pelo seu aceite, pelos ensinamentos, orientação, obrigada de coração professora.

*“Pés, para que os quero? Se tenho asas para voar.”*

*Frida Kahlo*

## RESUMO

No Norte do Brasil, o câncer gástrico (GC) é a segunda neoplasia mais frequente entre os homens e o terceiro nas mulheres, portanto, um importante problema de saúde pública. A investigação de fatores genéticos relacionados com características imunológicas pode auxiliar o entendimento da carcinogênese no CG. O objetivo do presente trabalho foi polimorfismos presentes nos genes das interleucinas IL17G-197A, IL 17FA7488G, TNF $\alpha$ G-308A, IL10G-1082A, IL10C-819T e IL10C-592A, em amostras de pacientes com câncer gástrico e sem câncer. O grupo caso foi composto por 100 pacientes diagnosticados com CG, atendidos no Hospital HUIBB (Pará, Brasil). O grupo controle foi constituído de 100 indivíduos, não aparentados, sem câncer da mesma população. O material genético foi extraído a partir de 5 mL de sangue periférico pelo kit comercial de DNA da Roche, seguido de quantificação com o NanoDrop 1000 spectrophotometer. Molecular analysis of the polymorphisms was performed by real-time PCR with TaqMan® probes. E as medidas de ancestralidade foram investigadas utilizando um painel de 48 marcadores autossômicos informativos de ancestralidade (AIMs). As proporções de ancestralidade de Europeu, Africano e Ameríndio foram estimadas usando o software STRUCTURE v.2.3.3. Como resultado, observou-se que a composição étnica do grupo com câncer foi de 27% africano, 42% europeu, e 31% de ameríndia. No grupo sem câncer, a composição foi de 21 % africano, 52% europeia, e 27% de ameríndia. Em relação ao conjunto de marcadores da interleucina IL-10 (IL10G-1082A, IL10C-819T, IL10C-592A), quando comparados os padrões genotípicos e haplotípicos observou-se que a distribuição haplotípica, quando relacionada a elevada expressão (GCC/GCC, GCC/GCA, GCC/GTC, GCA/GCA, GCA/GTA) foi mais frequente no grupo de pacientes com câncer gástrico ( $p=1,15E-11$ ; OR=2,630; IC 95%=2,116-3,271). Em indivíduos que possuíam o genótipo relacionado com a elevada produção de IL-10, detectou-se maior frequência da ancestralidade europeia no grupo de indivíduos controle ( $p=1E-06$ ), enquanto no grupo de pacientes com CG observou significativa frequência da ancestralidade africana ( $p=1.4 e-5$ ), pacientes que apresentaram genótipos TNF- $\alpha$  AA e TNF- $\alpha$  AG para mutação no gene TNF- $\alpha$ , apresentam risco elevado para desenvolvimento do câncer ( $P <000.1$ ; OR 10.375; IC 95% 3.149- 34.061). Concluímos que a distribuição haplotípica dos marcadores da interleucina IL-10 (IL10G-1082A, IL10C-819T, IL10C-592A) quando relacionados a elevada expressão e predominância de ancestralidade africana, possuem maior risco de desenvolvimento do CG.

**Palavras-chave:** Câncer gástrico, Polimorfismos, Citocinas, Ancestralidade.

## ABSTRACT

Gastric cancer (GC) is the second most common malignancy among men and the third in women, and therefore, an important public health problem in northern Brazil. The investigation of genetic factors related to immunological characteristics can aid the understanding of carcinogenesis in CG. The objective of the present work was investigate polymorphisms present in interleukin genes *IL17<sup>G-197A</sup>*, *IL 17F<sup>A7488G</sup>*, *TNF $\alpha$ <sup>G-308A</sup>*, *IL10<sup>G-1082A</sup>*, *IL10<sup>C-819T</sup>* e *IL10<sup>C-592A</sup>*, on samples of patients with gastric cancer and healthy patients without cancer. Case group was composed of 100 patients diagnosed with CG, met in the Hospital HUIBB (Pará, Brazil). Control group was composed of 100 individuals without cancer, unrelated, of the same population. The genetic material was extracted from 5 mL of peripheral blood with the DNA commercial kit from Roche, followed by quantification with the NanoDrop 1000 spectrophotometer. Analysis of the molecular polymorphisms was performed by real-time PCR with Taqman® probes. Measures of ancestry were investigated using a panel of 48 autosomal ancestry informative markers (AIMs). The proportions of ancestry of European, African and Amerindian were estimated using the software STRUCTURE v. 2.3.3. It was observed that the ethnic composition of the case group was 27% African, 42% European and 31% of Amerindian, while in the control group 21% African, 52% of European and 27% of Amerindian. In relation to the set of markers of interleukin IL-10 (*IL10<sup>G-1082A</sup>*, *IL10<sup>C-819T</sup>*, *IL10<sup>C-592A</sup>*), when the genotypic and haplotypic patterns were compared, it was noted that the haplotype distribution related to high expression (GCC/GCC, GCA, GCC/GCC/GTC, GCA/GCA, GCA/GTA) was more frequent in the patients with gastric cancer (P = 1,15e-11; OR = 2.630; IC 95% = 2.116-3.271). Among the individuals with the genotype related to the high production of IL-10, it was observed that the control group had more European contribution in their ancestry (P = 1e-06) while the group of patients with CG had more African contribution in their ancestry (P = 1.4e-5). Patients who presented *TNF- $\alpha$*  AA and *TNF- $\alpha$*  AG genotypes for *TNF- $\alpha$*  gene mutation presented a higher risk for development of cancer (P<0.001; OR 10.375; IC 95% 3.149-34.061). It is concluded that patients with a distribution of haplotypic markers of interleukin IL-10 (*IL10<sup>G-1082A</sup>*, *IL10<sup>C-819T</sup>*, *IL10<sup>C-592A</sup>*) related to a higher expression and higher contribution of African ancestry have a high risk of developing gastric cancer.

**Keywords:** Gastric cancer, Polymorphisms, Cytokines, Ancestry.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

### **Instituições Participantes:**

- Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO) - Universidade Federal do Pará (UFPA)
- Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) - Universidade Federal do Pará (UFPA)

### **Fontes Financiadoras:**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de amparo a pesquisa do estado do Pará (FAPESPA)

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

CG - Câncer gástrico

COX-1- CICLOOXAGENASE 1

COX-2 - CICLOOXAGENASE 2

MS - Ministério da Saúde

MiRNA - MicroRNA

IAM - Informative ancestry marker (Marcador informativo de ancestralidade)

Ils - Interleucinas

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 10

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 - Interleucina 17

INCA - Instituto nacional do câncer

INDEL - Inserção/Deleção

OR - Odds ratio (Taxa de risco)

UICC - União Internacional contra o Câncer

UFPA - Universidade Federal do Pará

PCR - Reação em cadeia pela polimerase

SNP - Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo de base única)

X<sup>2</sup> - qui-quadrado

TGFβ - Fator de crescimento e transformação

TNF-α - Fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Marcadores do câncer com capacidades distintas e complementares que permitem o crescimento tumoral e metastático; e as características emergentes que fornecem uma base sólida para compreensão da biologia do Câncer.....	16
FIGURA 2 –	Taxas brutas de incidência das localizações primárias* estimadas para 2016, em homens, no Brasil. (*Exceto pele não melanoma).	18
FIGURA 3 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma*	18
FIGURA 4 –	Cascata de lesões percussoras do Adenocarcinoma do Tipo intestinal	21
FIGURA 5 –	Respostas T helper 1, T helper 2, T helper 17	26
FIGURA 6 –	Estrutura do gene e localização dos polimorfismos funcionais em IL-10.	34
FIGURA 7 –	Representação gráfica do processo de detecção e amplificação de sonda TaqMan específica e seu controle endógeno pela metodologia de “discriminação alélica” na plataforma 7500 Real-Time PCR (Life Technologies), no exemplo, detecta-se um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo, onde a sonda FAM corresponde ao alelo selvagem e a sonda VIC ao alelo mutante.	42
FIGURA 8 –	Representação da miscigenação dos grupos estudados. Cada indivíduo é representado por um ponto colorido e sua localização no gráfico corresponde ao seu valor de proporção das ancestralidades. Os vértices mostram as etnicidades européia, africana, e ameríndia. Pacientes do grupo caso estão representados na cor verde e controles na cor rosa.	44
FIGURA 9 –	Box-Plot entre os grupos estudados, Considerando as distribuições das frequências das ancestralidades entre os fenótipos de média e alta produção de IL-10.	50

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Lista crescente de dados relatados nos achados clínicos e epidemiológicos para evidências circunstanciais em associação entre lesões crônicas anteriores e cânceres de locais específicos.....	25
TABELA 2 –	Descrição de características básicas imunológicas, genética e clínica da il17.....	35
TABELA 3 –	Variáveis clínicas e demográficas comparadas entre os grupos casos de câncer gástrico e controles fenotipicamente normais..	45
TABELA 4 –	Frequência dos haplótipos do gene il-10 em casos e controles..	46
TABELA 5 –	Análise dos haplótipos e fenótipos quanto a produção de il-10 em casos e controles.....	48
TABELA 6 –	Distribuição genotípica de polimorfismos dos genes <i>TNF-A</i> , <i>IL-17A</i> , <i>IL17F</i> investigados em casos e controles.....	51

## **LISTA DE APÊNDICES**

APÊNDICE	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
1 –	
APÊNDICE	PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
2 –	PESQUISA

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Considerações iniciais.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Epidemiologia do Câncer.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Câncer gástrico.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Processo Inflamatório Crônico e Susceptibilidade ao Câncer.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5</b>	<b>Citocinas e Polimorfismos.....</b>	<b>29</b>
<i>1.5.1</i>	<i>Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-<math>\alpha</math>).....</i>	<i>32</i>
<i>1.5.2</i>	<i>Interleucina 10 (IL10).....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.3</i>	<i>Interleucina 17 (IL 17).....</i>	<i>36</i>
<b>1.6</b>	<b>Ancestralidade.....</b>	<b>39</b>
<b>1.7</b>	<b>Aplicabilidades Clínicas.....</b>	<b>39</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>42</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Casuística.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Coleta de Amostras e a Extração do DNA.....</b>	<b>44</b>
<b>3.3</b>	<b>Genotipagem e análise de dados.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Ancestralidade.....</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>75</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Considerações Iniciais**

A carcinogênese é uma sequência de eventos que ocorre em múltiplos passos, dirigidos por alterações genéticas (mutações na molécula de DNA) e epigenéticas, que ocorrem aleatoriamente e afetam genes que controlam a proliferação, a sobrevivência celular e outras características associadas o fenótipo maligno. A formação de um tumor é um processo complexo, que pode se estender por décadas. Células consideradas normais evoluem para células com fenótipos denominados neoplásicos por um mecanismo denominado progressão tumoral (WEINBERG, R. 2008; TABORDA, A.G, 2011; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Hanahan & Weinberg (2000) abordam acontecimentos marcantes a nível celular, que resultam na formação de um tumor maligno. Neste modelo, as características do câncer incluem a indução de angiogênese permanente, potencial replicativo ilimitado, fuga da apoptose e a autossuficiência em sinais de crescimento, levando à características definidoras de tumores malignos, dando-lhes a capacidade de invadir tecidos vizinhos e promoção de metástase.

Este conceito de processo carcinogênico, mais recentemente acrescentou dois marcadores emergentes: a reprogramação do metabolismo energético celular (substituição da programação metabólica que opera na maioria dos tecidos normais, esses, que são combustíveis das operações fisiológicas das células associadas, com intenção de suportar o crescimento e proliferação celular contínua) e o escape da destruição pelo sistema Imune das células (evasão ativa por células cancerosas do ataque e eliminação por células do sistema imunológico), esse recurso destaca os papéis dicotômicos de um sistema imunológico que antagoniza e aumenta a progressão e o desenvolvimento do tumor. Foram acrescentadas também características habilitadoras: a instabilidade genômica/mutabilidade genética e inflamação promotora de tumorigênese (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Na Figura 1 são expostos os onze marcadores distintos e complementares do câncer que permitem o crescimento tumoral e metastático proporcionando uma base sólida para a compreensão da biologia do câncer, em conjunto com as com as características emergentes (reprogramação do metabolismo energético celular e escape da destruição pelo sistema Imune) possuem poder de mutabilidade das células

cancerosas com alterações genéticas que levam a progressão do tumor; e a ação de células imunes que normalmente agem na inflamação destinadas a combater infecções e cicatrizar lesões e em alguns casos podem resultar em indução de tumores como consequências de respostas inflamatórias (HANAHAN & WEINBERG, 2011).



**Figura 1.** Marcadores do câncer com capacidades distintas e complementares que permitem o crescimento tumoral e metastático; e as características emergentes que fornecem uma base sólida para compreensão da biologia do Câncer.

Estudos recentes identificaram genes relacionados a resposta imune que, quando altamente expressos, podem provocar o desenvolvimento da patologia gástrica. Entre genes envolvidos destacamos os da interleucina-1 (*IL1*), interleucina-8 (*IL8*), interleucina-10 (*IL10*) e fator de necrose tumoral alfa (*TNF $\alpha$* ), onde polimorfismos específicos foram associados com o risco de câncer gástrico (RAFIEI, A *et al.*, 2013; YU, Z *et al.*, 2013; GUO, X *et al.*, 2013; GONDA, T; TU, S; WANG, T. 2009).

Sugere-se que a inflamação desempenha um papel importante na capacidade das células tumorais para invadir e promover metástase. Uma das observações mais marcantes é a capacidade das células tumorais epiteliais expressarem durante a metástase, receptores específicos de quimiocinas. Este processo é apoiado por secreção

parácrina de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL1  $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ) assim como determinada produção de citocina autócrina.

A citocina pró-inflamatória IL17A (IL17) pertence a um grupo maior de ligantes da família de IL17 e é na sua essência produzida a partir de um subconjunto de células efectoras CD4 + conhecidas como células Th17 (RAFIEI, A *et al.*, 2013).

O percurso da patogênese da gastrite crônica ao câncer gástrico, que pode ser desencadeado por *H. pylori*, os neutrófilos ativados por hospedeiros e células mononucleares podem produzir não só citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina IL1b, IL6, IL8 e Fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), mas também as citocinas anti-inflamatórias como de IL10 (XUE, H *et al.*, 2012). Assim, a inflamação associada a proteínas pode servir como potencial biomarcador para prever a agressividade e / ou gravidade de vários tipos de câncer. (WANG, J *et al.*, 2015)

América Latina apresenta como cenário comum, uma população com altas taxas de infecção por *H. pylori*, a pobreza persistente, os hábitos alimentares, juntamente com tendências seculares em exposições ambientais e estilo de vida. Aliado a este contexto, a genética pode oferecer uma ferramenta útil para a comparação de populações e avaliar interações gene-ambiente que podem sublinhar o desenvolvimento de câncer gástrico. (CHIUARILLO, 2014).

## 1.2 Epidemiologia do Câncer

O Câncer gástrico apesar de ter sido a segunda causa de morte por câncer no mundo em ambos os sexos em 2012, a série histórica das taxas de mortalidade apresentou declínio ao longo do tempo em vários países (INCA, 2016). Essa tendência repete-se na série temporal das taxas de incidência.

“A alta mortalidade é registrada atualmente na América Latina, principalmente na Costa Rica, Chile e Colômbia. Porém, o maior número de casos ainda ocorre no Japão, onde se destaca 780 doentes por 100.000 habitantes” (INCA, 2013).

O câncer de estômago é frequente no Brasil. Na região Norte, o CG é a segunda neoplasia mais frequente entre os homens e o terceiro nas mulheres. No Estado do Pará, norte do Brasil, a taxa de sobrevida em cinco anos é de cerca de 9-10% (LEAL, M *et al.*, 2012).

Foram estimados para o ano de 2016 cerca 1460 casos novos no estado do Pará, segundo o Instituto Nacional do Câncer. É o quarto tipo de câncer mais comum no homem, atrás apenas do câncer de próstata, pulmão, cólon/reto (Figura 2). Na mulher, é o quinto mais incidente, atrás do câncer de mama, colo do útero, cólon/reto e pulmão .



**Figura 2.** Taxas brutas de incidência das localizações primárias\* estimadas para 2016, em homens, no Brasil. (\*Exceto pele não melanoma).

Fonte: [//www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf](http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf)

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	2 470	28,6%	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Colo do Útero	1 970	23,1%
Estômago	970	11,2%			Mama Feminina	1 810	21,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	680	7,9%			Cólon e Reto	480	5,6%
Cólon e Reto	440	5,1%			Estômago	480	5,6%
Bexiga	370	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	410	4,8%
Leucemias	310	3,6%			Glândula Tireoide	270	3,2%
Cavidade Oral	290	3,4%			Leucemias	250	2,9%
Laringe	250	2,9%			Ovário	250	2,9%
Linfoma não Hodgkin	230	2,7%			Corpo do Útero	230	2,7%
Sistema Nervoso Central	230	2,7%			Sistema Nervoso Central	190	2,2%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 3.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma\*

Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

Segundo Vinagre; Campos; Souza, (2012) os hábitos alimentares da população do Pará no século XX combinam algumas características que potencialmente favorecem o processo de carcinogênese gástrica. A cidade de Belém apresentou, em 1978, uma taxa de 27,8/100.000 e, em 1989, esse coeficiente era de 10,1/100.000, com uma

tendência decrescente constante da mortalidade. (REZENDE, 2002). Entre as neoplasias, o CG foi a primeira causa de morte no Estado do Pará em 1996 e 1997, correspondendo a 16,1% (1996) e a 14,2% (1997) dos óbitos. No sexo masculino, esta neoplasia foi responsável por 20,3% dos óbitos por neoplasias naquele Estado, em 1996, se constituindo na primeira causa de morte, e por 17,5%, no ano seguinte, ocupando a segunda posição, logo atrás do câncer de pulmão (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SIM, 1999).

Em 2030, estima-se 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

A Epidemiologia molecular tem confirmado que a maior parte dos casos de carcinogênese gástrica resulta de eventos complexos e multifatoriais, que ocorrem em várias etapas. Portanto, a interação do meio ambiente e a susceptibilidade genética do indivíduo desempenham um papel importante neste processo. Por outro lado, os mecanismos exatos de carcinogênese ainda não estão totalmente compreendidos (RAFIEI, A *et al.*, 2013).

Segundo as estimativas para 2014, o câncer gástrico é o quarto colocado no País, segundo tumor mais frequente nas regiões Norte (11 casos/100 mil) e Nordeste (10 casos/100 mil). Está em quarto lugar nas regiões Centro-Oeste (11 casos/100 mil) e Sul (16 casos/100 mil) e na quinta colocação na região Sudeste (15 casos/100 mil) (Figura 1).

O CG é responsável por 8% do total de casos de câncer e 10% do total de mortes de câncer. Mais de 70% dos novos casos e mortes ocorrem em regiões em desenvolvimento. Ásia Oriental, Europa Oriental e América do Sul têm a maior incidência de câncer de estômago, considerando que, na América do Norte e parte da África podem ser encontrados números mais baixos (LANSDORP-VOGELAAR, I *et al.*, 2013 ).

Câncer gástrico representa um encargo de saúde em todo o mundo. Seu prognóstico é sombrio, na maioria dos países, exceto no Japão onde enormes programas de detecção precoce estão em andamento. A maioria dos países utiliza como estratégia para controlar a doença a prevenção, facilitada pela existência de um longo processo pré-canceroso (CORREA & PIAZUELO, 2012), a taxa de mundial de sobrevida média cumulativa em cinco anos, pós-diagnóstico é estimada em 21% (PELUCCHI *et al.*,

2015). Em Belém, essa taxa é de cerca de 9-10%, tornando assim, o câncer gástrico um grave problema de saúde pública no Estado (RESENDE *et al.*, 2006). A baixa sobrevivência em relação a países emergentes deve-se em parte ao diagnóstico tardio dessa malignidade, em sua maioria, quando o CG encontra-se em estadiamento avançado (MCLEAN & EL-OMAR, 2014).

Divergências regionais nos dados da incidência do CG e na localização primária da neoplasia demonstram variabilidade em relação à susceptibilidade genética, com alguns fenótipos histológicos ligeiramente predominantes, assim como os fatores de risco, como padrão da alimentação e a prevalência de infecção por *Helicobacter pylori*. (CORREA & PIAZUELO, 2012; ORDITURA *et al.*, 2014; RESENDE *et al.*, 2006).

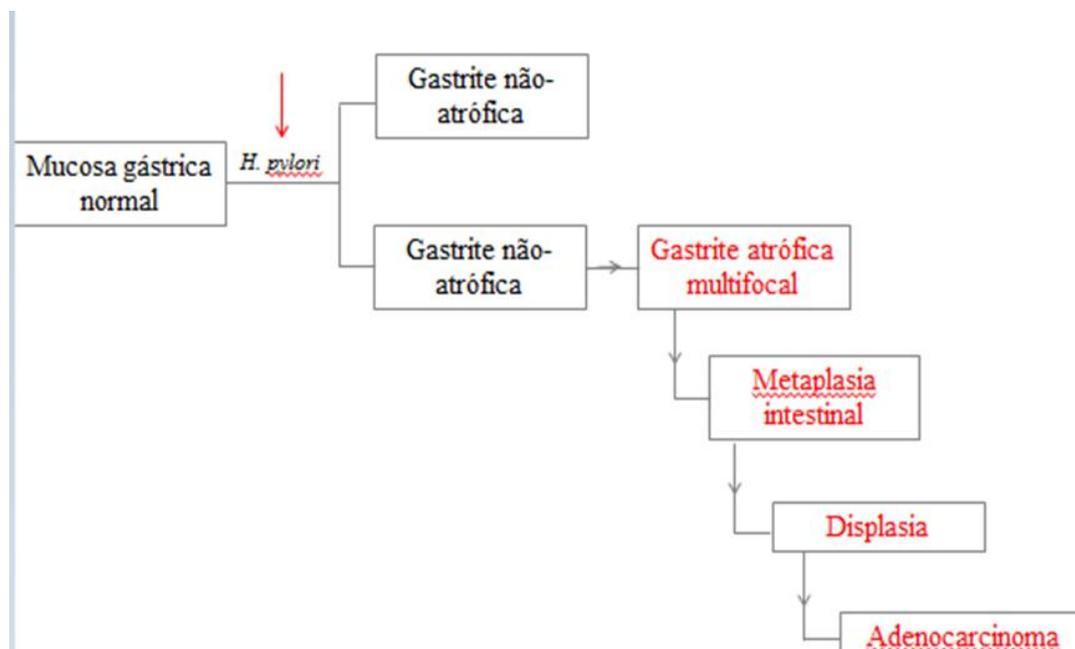
### 1.3 Câncer Gástrico

Os tumores do estômago mostram-se, predominantemente, em três tipos histológicos: adenocarcinoma (responsável por 95% dos tumores), linfoma, diagnosticado em cerca de 3% dos casos, e leiomiossarcoma, iniciado em tecidos que dão origem aos músculos e aos ossos (INCA, 2014).

Vários genes e proteínas têm sido propostos como biomarcadores da carcinogênese gástrica em múltiplos estágios do CG, alterações dos oncogenes bem como supressores de tumor já foram relatados. Embora a desregulação desses genes/-proteínas tenha sido intensamente estudada no CG, a criação de perfis mais completos se faz necessário para compreender o processo de carcinogênese (LEAL, M *et al.*, 2012).

Foi proposto por Pelayo de Correa (1988) um modelo para a cascata de múltiplos passos de desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, que consiste de uma progressão superficial da gastrite crônica (não atrófica), a gastrite atrófica crônica, a metaplasia intestinal, e, finalmente, ao adenocarcinoma gástrico. Neste modelo de hipótese, a sequência de lesões pré-cancerosas existe como um processo dinâmico, a parte, de uma infecção inicial superficial causada pela infecção por *H. pylori* que pode originar, num percentual muito baixo, uma neoplasia maligna de estômago. Assim, a infecção crônica da mucosa gástrica por *H. pylori* é um importante fator de risco que pode ser atribuído ao mecanismo da carcinogênese gástrica (CHIURILLO, M, 2014), (CHUNG, H. W, LIM, J.B *et al.*, 2014).

O tempo decorrido para a transformação de lesões gástricas pré-malignas em câncer gástrico é desconhecida, mas acredita-se levar décadas. Esta fase latente longa fornece uma excelente janela de oportunidade para a detecção precoce, tratamento, prevenção do câncer por meio de uma intervenção precoce, como a erradicação do *Helicobacter pylori* (LANSDORP-VOGELAAR, I *et al.*, 2013). A figura 4 mostra a sequência de lesões que podem preceder o adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal.



**Figura 4.** Cascata de lesões precursoras do Adenocarcinoma do Tipo intestinal.

Do ponto de vista epidemiológico, a *Helicobacter pylori* gástrica é considerada uma das infecções mais comuns em humanos e ocorre em metade da população do mundo, é um dos fatores mais comumente relacionados ao aumento do risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma de estômago distal (ASSUMPCÃO, M, 2010).

#### 1.4 Processo Inflamatório Crônico e Susceptibilidade ao Câncer.

A inflamação aguda caracteriza-se pela permeabilidade vascular, edema e abscesso. O termo crônico refere-se a tempo (cronologia), logo, pode-se afirmar que a inflamação é de longa duração. No processo de inflamação crônica nota-se a participação de células mononucleadas (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) e fenômenos proliferativos (fibrose e angiogênese), havendo concomitantemente fenômenos de inflamação aguda (destruição), de reparação (tecido de granulação e

fibrose), de resposta imune, mantendo-se equilíbrio entre hospedeiro e agente agressor (PEREIRA, P. 2004).

Na segunda metade do século XIX, Rudolf Virchow (1863), ao observar a presença de infiltrado leucocitário em tecidos neoplásicos, sugeriu que o processo inflamatório estaria na origem da transformação neoplásica (PEREIRA, P. 2004).

A indução da inflamação contribui para a tumorigênese, a qual é caracterizada pela síntese de citocinas, fatores de crescimento e os metabólitos de ácido araquidônico, incluindo as prostaglandinas (PGs) (RUNDHAUG J. E. *et al.*, 2011). As células inflamatórias e fatores solúveis estão presentes em todos os tumores. Os sinais de inflamação "latente" que incluem a remodelação do tecido, angiogênese e outros recursos de cura do tipo de ferida, são comumente utilizados por patologistas como pistas morfológicas do câncer invasivo.

Há vários anos, os pesquisadores tentam identificar os mecanismos exatos responsáveis pela formação de neoplasias no interior do tecido gástrico. Até agora, vários fatores de risco foram definidos, bem como algumas mutações genéticas cruciais que podem estar envolvidos na tumorigênese gástrica. No entanto, dentro últimos anos, muita atenção tem sido dada à imunologia e interações entre citocinas, que podem não só contribuir para o desenvolvimento, mas também para progressão e metástase destes tumores. Estudos multicêntricos demonstraram que a presença de vários polimorfismos em genes que codificam interleucinas, tais como IL-1, IL-6 e / ou IL-8 estão fortemente associadas a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer gástrico (MADEJ-MICHNIEWICZ, A *et al.* 2015; GONZALEZ-HORMAZABAL, P, *et al.* 2014; WANG, X. Q. *et al.*, 2014).

As respostas imunes incluem imunidade inata e imunidade adaptativa. Respostas imunes associadas ao tumor podem ser atribuídas ao tipo 1, em que os linfócitos Th1 e macrófagos M1 polarizados, limitam a progressão do tumor, e ao tipo 2, em que os linfócitos Th2 e macrófagos M2 favorecem a fuga da resposta imunológica e favorecem a progressão da doença. As células *Natural Killer* (NK) são um subconjunto de linfócitos que participam na imunidade inata. As células dendríticas são coparticipantes em ambas as respostas. Macrófagos associados a tumores (TAMs) têm emergido como alvos promissores para imunoterapia anti-câncer. Células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC) bloqueiam a imunidade adaptativa. Células T citotóxicas direcionadas contra antígenos endógenos expressos e são apresentados a células cancerígenas, são criticamente atingidas em imunoterapias antígeno-específicas contra o

câncer. Enquanto isso, a COX-2 contribui para a resistência à imunoterapias contra o câncer (LIU, B; QU, L; YAN, L.2015; MADEJ-MICHNIEWICZ, A *et al.* 2015)

Tumores estimulam respostas imunológicas específicas adaptativas, observações clínicas e experimentais com animais comprovam que, apesar de as células tumorais serem provenientes das próprias células do hospedeiro, os tumores provocam respostas imunológicas. Demonstrou-se que muitos tumores são circundados por infiltrados de células mononucleares compostos por linfócitos T, células assassinas naturais (*natural Killer-NK*) e macrófagos, além disso, linfócitos e macrófagos ativados encontram-se presentes nos linfonodos, drenando os locais de crescimento tumoral (ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. 2012).

Uma grande variedade de antígenos tumorais que podem ser reconhecidos por linfócitos T e B foi observada em cânceres humanos e de outros animais. Antígenos expressos especificamente em células tumorais, mas não em células sem câncer, são chamados de antígenos específicos de tumores. Antígenos tumorais que também são expressos em células sem câncer são chamados de antígenos associados a tumores, na maioria das vezes esses antígenos são constituintes de células normais, no entanto, sua expressão é desregulada em tumores. Muitos cânceres desenvolvem mecanismos de forma que evitem respostas imunológicas antitumorais, esses mecanismos podem ser intrínsecos ou extrínsecos, ou seja, podem ser mediados por células tumorais ou mediados por outras células (ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. 2012)

Na gastrite crônica induzida pela infecção por *H. pylori* crônica, superexpressão de COX-2, provavelmente induzida por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, e espécies reativas de oxigênio que levam a mutagênese e subsequente metaplasia, displasia e neoplasia (KONTUREK, P.C.2009). O desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose causada principalmente por produtos de COX-2 leva a carcinogênese.

Estudos têm demonstrado que indivíduos propensos a distúrbios inflamatórios crônicos têm um risco aumentado de desenvolvimento de câncer (CHUNG; H.W; LIN, J.B. 2014; PUTOCZKI, T *et al.*, 2013; DEMARIA, S *et al.*, 2010). Inflamação crônica é um fator de risco apontado para o desenvolvimento de câncer humano, e sugere-se que ao menos um terço de todos os cânceres humanos têm sido associados à inflamação (MATKOWSKYJ, 2014; KHATAMI, M, 2014).

Um crescente corpo de evidências indica que a inflamação está intimamente associada com a iniciação, progressão e metástase de vários tumores, incluindo os de

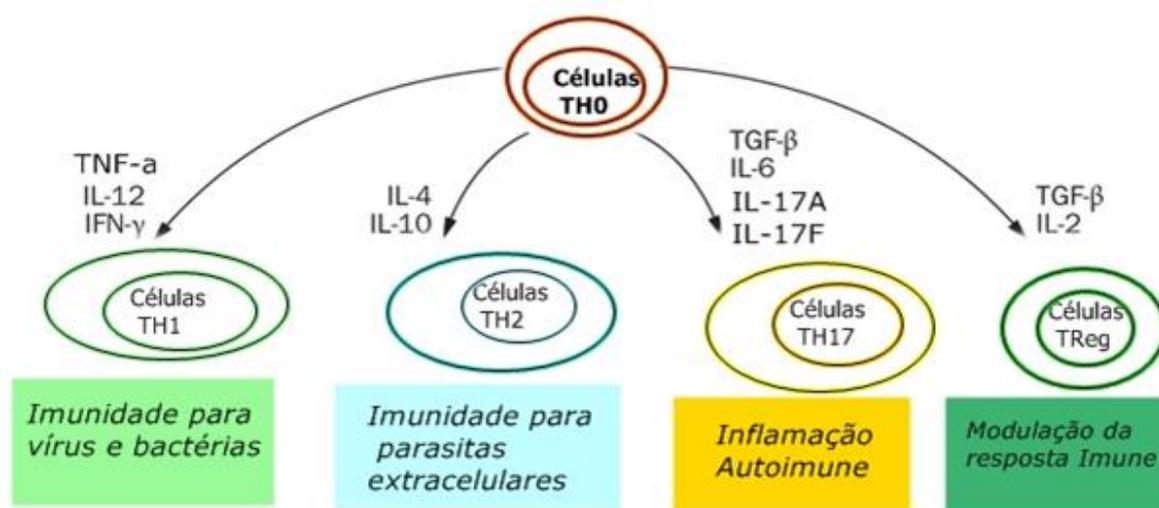
câncer gástrico (LEE, K *et al.*, 2014.; DEMARIA, S *et al.*, 2010.; MILLER, L *et al.*, 2007.; KATHAMI, M; 2012). Em estudos realizados na mucosa gástrica em populações de alto risco como a população asiática, têm revelado uma série de lesões que, sequencialmente, evoluiriam da condição normal para gastrite crônica não-atrótica, e então para gastrite atrótica e metaplasia intestinal e, finalmente, para displasia e adenocarcinoma. A Tabela 1 demonstra uma lista crescente de dados relatados nos achados clínicos e epidemiológicos para evidências circunstanciais em associação entre lesões crônicas anteriores e cânceres de locais específicos, demonstrando forte associação entre lesões inflamatórias e processos tumorais (MILLER, L *et al.*, 2007; KATHAMI, M.; 2012).

**Tabela 1.** Lista de achados clínicos, para evidências circunstanciais em associação entre lesões crônicas anteriores e cânceres de locais específicos (KATHAMI, M; 2012).

<b>Doença Inflamatória</b>	<b>Tumor (Câncer)</b>
Colite ulcerosa (doença de Crohn)	Bowel/Cólon
Esquistossomose, Cálculos, Catéteres	Bexiga
Prostatite	Próstata
Condições inflamatórias	Mama
Barrets	Esôfago
Pancreatite	Pâncreas
Infecção Gástrica, ( <i>H. pylori</i> )	Estômago
Úlcera gástrica, Gastrite, Asma, Enfisema, Tabagismo	Pulmão
Hepatite B e C	Fígado
Melanoma, queimaduras/radiação	Pele
Tireodite	Tireóide

Há cerca de 20 anos, os Linfócitos T efetores CD4+ foram categorizados em dois subtipos distintos, *T helper 1* (Th1) e *T helper 2* (Th2), seguindo o padrão de citocinas produzido, como na diferenciação de células B, esta diversidade é dependente de citocinas e antígenos que desencadeiam células T CD4 + precursoras por meio de maturação em células produtoras de citocinas do tipo 1 [interferon (IFN)  $\gamma$  e interleucina (IL) -2] ou tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-13) (MOSMANN. TR, COFFMAN. RL, 1989 .; NAKAYAMADA, S. 2012.; SOUZA, A *et al.*, 2010). Alguns autores valorizavam ainda a existência de uma terceira população celular, as células Th0, representadas por linfócitos indiferenciados capazes de produzir citocinas do perfil Th1 e Th2 (SOUZA, A *et al.*, 2010 ; CRAFT JE, 2012 ; HERNANDEZ, A. 2009). Duas outras subpopulações foram subsequentemente identificadas: células T reguladoras (Treg), responsáveis pela produção de IL-10 e fator de crescimento transformante TGF- $\beta$  e células T CD4 + (Th17) IL-17, produtoras de IL-17. (OHKURA, N *et al.*, 2013). Estes dois subconjuntos desempenham um papel fundamental durante a tolerância e a

resposta inflamatória. Outras investigações adicionaram ao nosso conhecimento através da definição precisa das subpopulações de células Th17 e identificação de subconjuntos efetoras adicionais, como Th22, Th9, e célula T colaboradora (LTh) (HARRINGTON, LE *et al.* 2005; PARK, H *et al.*, 2005; OHKURA, N *et al.*, 2013; HERNANDEZ, A. 2009). O papel das células Th17 durante o desenvolvimento de doenças auto-imunes tem sido largamente descrita ao longo dos últimos anos (HARRINGTON, LE *et al.*, 2005; PARK, H *et al.*, 2005). Na figura 5, as respostas T helper 1, T helper 2, T helper 17 são demonstradas



**Figura 5.** Respostas T helper 1, T helper 2, T helper 17

Fonte: <http://www.nature.com/nrrheum/journal/v10/n12/full/nrrheum.2014.127.html> (CALABRESE, L.H; ROSE-JOHN, S.2014)

As citocinas, incluindo IL1, IL6 e TNF $\alpha$  são reguladores da resposta do hospedeiro à infecção, e exercem funções distintas na rede de inflamação relacionada ao câncer. Algumas citocinas facilitam o desenvolvimento de câncer correlacionado à inflamação, ao passo que outras atuam como supressores. Os linfócitos T são uma fonte importante de citocinas produzidas por Th1 e Th2, as citocinas do tipo Th1 (por exemplo, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL12 ) exercem atividade pró-inflamatórias e citocinas tipo Th2 (por exemplo , IL4 , IL5 , IL10 , IL13 ) exercem por sua vez, atividades anti-inflamatórias. Altos níveis de IL12 em amostras de CG parece estar relacionado a melhor prognóstico em pacientes com câncer avançado.

Por outro lado, um aumento do nível de IL10 aparenta ser um fator de mal prognóstico em pacientes com CG. O relativo equilíbrio entre citocinas Th1 e Th2 parece ser um importante fator na inflamação relacionada ao câncer (CHANG, WT *et al.*, 2014).

Durante a carcinogênese, células inflamatórias do tumor infiltrado irão produzir uma variedade de citocinas. Tem sido relatado que citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF $\alpha$ , Interleucinas (IL1 $\beta$ , IL6) e GM-CSF contribuem para carcinogênese pela indução da sobrevivência, crescimento, proliferação, diferenciação e metástase das células tumorais (SAKTHIVEL; GURUVAYOORAPPAN, 2013).

No estroma do tumor gástrico, há frequentemente a presença de células brancas do sangue, mas se há influência destas células inflamatórias na iniciação e/ou progressão da patogênese gástrica, permanece indeterminada (LEE, K *et al.*, 2014). Estudos genéticos de pacientes com atrofia gástrica e carcinoma revelaram um crescimento na incidência de modificações genéticas efetivamente associadas com respostas imunitárias do hospedeiro. Vidal *et al.* (2015) demonstraram em estudo realizado com *hsa-miR-29c* (MiRNA caracterizado por ser altamente expresso na mucosa gástrica normal) que seus níveis de expressão são mais elevados em amostras com mucosa gástrica normal, mostrando uma redução de maneira progressiva nas amostras de gastrite crônica não atrófica, e que as amostras de metaplasia intestinal e amostras de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal tiveram padrão semelhante de expressão.

O processo de indução do sistema imunológico, para destruir seletivamente tecidos tumorais *in vivo* enfrenta numerosos obstáculos. O processo de colonização do *H. pylori*, quando bem sucedido, é acompanhado por uma resposta inflamatória local envolvendo tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa, citocinas como a IL1, IL6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL 8, IL21, o interferon gama (IFN $\gamma$ ) e fator de crescimento e transformação ( TGF $\beta$  ), encontram-se em níveis aumentados na mucosa gástrica de pacientes com gastrite associada a *H. pylori*, se comparados aos níveis de controles sem gastrite, sem *H. Pylori* (FEHLINGS, M *et al.*, 2012).

Infecção por *H. pylori* origina a inflamação por meio de uma variedade de vias, induzida tanto em células epiteliais gástricas, que inicialmente entram em contato com o local da infecção e em células imunes recrutadas para circulação. As moléculas inflamatórias encontradas a serem reguladas em pacientes infectados com *H. pylori* incluem IL1, IL6, IL8 e TNF $\alpha$ . (LAMB, A; CHEN, L, 2013).b

A infecção por *H.pylori* tem mostrado estimular a migração de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, para o trato gastrointestinal através da indução da produção de citocinas, um fenômeno postulado para prover células transdiferenciáveis por onde adenocarcinomas podem surgir (LAMB, A; CHEN, L, 2013).

Na visão epigenética, nota-se que apesar da erradicação da *H. pylori* contribuir para redução do nível de metilação no promotor, certa quantidade de metilação ainda permanece (MATSUSAKA, K. 2014). Esta observação sugere que não somente células epiteliais gástricas totalmente diferenciadas, mas também as células estaminais/-progenitoras podem adquirir metilação aberrante. Na colite ulcerosa humana e da hepatite, a expressão aumentada de IL1 $\beta$ , IL8, NOS2 e TNF foi observada, e estes genes podem representar um fator comum associado com a indução de metilação aberrante do DNA durante a inflamação crônica (MATSUSAKA, K. 2014).

Além de citocinas e fatores de crescimento, ciclooxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) foram implicados na carcinogênese e na progressão metastática de diversos tipos de câncer (GARCÍA-GONZÁLEZ, M; NICOLÁS-PÉREZ, D; QUINTERO, E, 2012). Ciclooxigenases ou prostaglandinas sintase G-/H (PTGSs) catalisam a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. A COX-1 (PTGS-1) é expressa constitutivamente e desempenha um papel fundamental na proteção da mucosa gástrica. Muitos cânceres humanos são relatados por ter níveis elevados de COX-2 e superprodução prostaglandinas (WANG, D; DUBOIS, R.N. 2006). O câncer de estômago é exemplo disso.

## 1.5 Citocinas e Polimorfismos

As alterações genéticas do tipo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são responsáveis por > 90% das variações no genoma humano, enquanto os 10% restante das variações incluem as aberrações cromossômicas, número de cópias de DNA e microssatélites (A,BAG; NS, JYALA; N, BAG. 2012). Devido a sua preponderância no genoma humano (cerca de um em cada 1.000 pares de bases), estes SNP(s) de genes candidatos têm sido amplamente explorados na associação com várias doenças, dentre as quais o câncer.

O primeiro polimorfismo de citocina associado ao desenvolvimento do câncer gástrico foi relatado por El-Omar e colaboradores (2001). Este polimorfismo envolvido

de transições T-C nas posições -511 e -31 do gene *IL-1B*, respectivamente, bem como a presença de uma repetição em tandem penta-alélica no intron 2 do gene antagonista do receptor IL-1 (*IL-1RN*) (EL-OMAR *et al.*, 2000).

Estes polimorfismos se localizam frequentemente em sequências de DNA que regulam a transcrição e, deste modo, podem ser funcionalmente importantes (PEREIRA, P. 2004). Quando estão relacionados ao processo inflamatório e a desregulação da produção de citocinas são considerados importantes na primeira etapa da fase pré-cancerosa (CHIURILLO *et al.*, 2014)..

As ILs representam uma rede diferenciada de citocinas que são pequenas moléculas de proteína de sinalização celular que medeiam a função do sistema imunológico no ser humano. São produzidas predominantemente por células T, monócitos, macrófagos e células endoteliais, assumem múltiplos papéis, incluindo facilitar a comunicação entre células imunitárias, controlando os genes, que regulam a transcrição fatores, e que regem a inflamação, diferenciação, a proliferação e secreção de anticorpos (PAN, X *et al.*, 2013). Alguns dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias são extremamente polimórficos.

Citocinas também são importantes reguladores da resposta imune e das reações inflamatórias, desempenham um papel central na inflamação gastro-intestinal. São proteínas solúveis de baixo peso molecular que podem ser produzidas por diferentes tipos celulares. São mediadoras e moduladoras de reações imunes e inflamatórias, podendo também atuar como promotoras do crescimento e influenciar as funções celulares de forma autócrina, parácrina ou endócrina. Desequilíbrios na produção de citocinas podem ter consequências patológicas (LIMA, T.D.B *et al.*, 2009). São importantes mediadores na fisiologia e fisiopatologia gástrica e podem desempenhar papel importante na etiologia do câncer gástrico (por exemplo, IL1 controla a acidez do estômago, a IL8 estimula a proliferação de células endoteliais, a IL10 regula negativamente a resposta citotóxica, e a citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$  medeia respostas inflamatórias) (PERSSON, C *et al.*, 2010).

A produção de citocinas pode ser alterada por polimorfismos genéticos dentro das regiões de codificação e promotoras de genes de citocinas. Portanto, uma predisposição genética para a alta ou baixa produção de uma citocina particular, pode afetar a suscetibilidade e evolução clínica da doença (QIN, S *et al.*, 2013).

Sabe-se que fatores infecciosos, ambientais, genéticos e epigenéticos estão envolvidos na carcinogênese gástrica, mas a proporção de pessoas que, finalmente, desenvolvem o câncer gástrico após serem expostas aos fatores de risco, como infecção por *Helicobacter pylori* é pequena, sugerindo que a susceptibilidade genética causada por (SNPs) de genes suscetíveis, poderia desempenhar um papel importante neste processo (XUE, H *et al.*, 2012).

Os polimorfismos de citocinas e de genes receptores de citocinas podem influenciar a sua funcionalidade controlando a expressão do gene, a estabilidade do mRNA ou da proteína estrutural e ter consequências patológicas evidentes, incluindo maior susceptibilidade às infecções e doenças crônicas (SODSAI, P *et al.*, 2013). Estão associados com diferentes níveis de mRNA do indivíduo nas citocinas da mucosa gástrica, que resultam em diferenças nos níveis da inflamação da mucosa gástrica, inibição ácida e risco da doença gastroduodenal em resposta à infecção por *H. pylori* (SUGIMOTO, M; YOSHIO YAMAOKA, Y; FURUTA, T. 2010).

Vários destes polimorfismos podem regular os níveis de transcrição de genes e influenciar a susceptibilidade ao câncer, do desenvolvimento ao prognóstico. (Y.M, ZHANG; X.C, ZHOU; Z, XU; C.J, TANG, 2012). As variações individuais do risco ao CG têm sido associadas com polimorfismos específicos que estão presentes em uma proporção significativa da população normal (PAN, X *et al.*, 2013).

A desregulação entre as interações IL e interrupções na via JAK-/-STAT (Janus associada a quinase-/- transdutores de sinais e ativadores de transcrição) pode provocar danos ao DNA, como proliferação excessiva no tumor induzindo distúrbios imunológicos, angiogênese, e displasia, fenômeno que também pode estar associado ao processo de malignidade e metástase gástrica (PAN, X *et al.*, 2013).

Fatores genéticos desempenham papel essencial no equilíbrio das interleucinas, e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de genes que codificam interleucinas e seus receptores podem alterar a função da citocina e desregular a sua expressão. Consequentemente, as diferenças genéticas individuais causadas por SNPs podem estar intimamente relacionadas a estas interrupções e eventualmente desempenhar um papel na carcinogênese gástrica (PAN, X *et al.*, 2013).

Por exemplo, os tumores do tipo intestinal, de acordo com estimativas de risco, quando feitas possíveis associações a polimorfismos em genes de citocinas, são os mais frequentes e são precedidos por um conjunto de lesões pré-cancerosas sequenciais, a partir do qual a metaplasia intestinal é muito mais frequente do que a displasia e mais

fortemente associados com câncer gástrico do que atrofia gástrica (PELETEIRO, B *et al.*, 2010).

#### 1.5.1 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )

O Fator de Necrose Tumoral-Alfa é principalmente produzido por macrófagos, uma citocina multifuncional que desempenha papel importante nas patogêneses inflamatórias, auto-imunes e doenças malignas. O gene *TNF $\alpha$*  está localizado no complexo principal de histocompatibilidade complexa classe III na região no braço curto do cromossomo 6. Muitos polimorfismos na região promotora do gene são identificados e têm sido utilizados na regulação da transcrição de *TNF $\alpha$*  (GUO, X *et al.*, 2013). Cinco polimorfismos importantes do gene *TNF $\alpha$*  têm sido descritos na região promotora G-38A, G-308A, C-857T, C-863A e T-1031C (BHAYAL, A.C *et al.*, 2013).

Fator de necrose tumoral- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, secretada e ativada por macrófagos, com uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo a indução da regressão do tumor, febre, emagrecimento, choque, e resposta imune celular (TOLIDE-IE, H; TABATABAEE, R; KAMALI-SARVESTANI, E. 2014).

TNF $\alpha$  quando induzida por *H. pylori*, inibe a secreção de ácido gástrico. Portanto, tem papel importante na defesa do hospedeiro contra o *H. pylori*. Parte da produção de TNF- $\alpha$  é regulada em nível de transcrição, e muitos estudos têm implicado polimorfismos em *TNF- $\alpha$*  como potenciais determinantes de susceptibilidade ao CG. (SANTOS, J.C *et al.*, 2012).

Os polimorfismos de genes de citocinas, como os de *TNF $\alpha$* , podem ser utilizados para identificar grupos de maior risco ao câncer de estômago e úlcera péptica, assim como do emprego em terapias adequadas para prevenção e erradicação do *H. pylori* em populações ocidentais (SUGIMOTO, M; YOSHIO YAMAOKA, Y; FURUTA, T. 2010).

#### *TNF- $\alpha$* (G-308A)

Um polimorfismo no gene *TNF $\alpha$* , na posição G-308A do seu promotor definido como *TNF1*<sup>-308G</sup> e *TNF2*<sup>-308A</sup>, tem sido identificado em várias populações humanas. Especificamente o alelo *TNF $\alpha$* <sup>\*-308A</sup> (rs1800629) está associado com uma elevada produção de TNF $\alpha$  (QIN, B *et al.*, 2013); (TOLIDE-IE, H; TABATABAEE, R;

KAMALI-SARVESTANI, E, 2014). Este polimorfismo é o mais estudado em cânceres do sistema digestivo (GUO, X *et al.*, 2013).

A literatura tem mostrado associação entre o polimorfismo *TNF $\alpha$  G<sup>-308A</sup>* com doenças em distintas populações, apesar da identificação de resultados conflitantes em diferentes tipos de populações (TOLIDE-IE, H; TABATABAEE, R; KAMALI-SARVESTANI, E. 2014); (ROTAR, IC *et al.*, 2014); (GUO, X *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao câncer gástrico, polimorfismos do gene de citocinas têm sido associados com os resultados consistentes referindo-se ao aumento do risco de câncer gástrico associado a *TNF $\alpha$  G<sup>-308A</sup>* apesar dos resultados serem heterogêneos (PELETEIRO, B, *et al.* 2010).

### 1.5.2 Interleucina 10 (IL10)

A interleucina 10 (IL10) foi descoberta por Fiorentino e colegas em 1989, por sua capacidade de inibir a síntese de IL-2 e interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) por células Th1. “IL10 é uma potente citocina pleiotrópica que tem a dupla capacidade, possui propriedades anticancerígenas imunossupressoras ou propriedades imunoestimulantes” (NI, P. *et al.*, 2011).

Como fator produzido por células T helper 2 (Th2), IL-10 inibe a produção de citocinas por células Th1. Têm sido mostrados efeitos estimulantes adicionais de IL10 em timócitos, células B e mastócitos (ZHANG, Q *et al.*, 2014).

IL10 tem sido reconhecida como tendo atividade anti-inflamatória potente por um longo período de tempo, e é demonstrado ser um supressor endógeno importante da reabsorção óssea estimulada por infecção in vivo (ZHANG, Q *et al.*, 2014). Esta capacidade é facilitadora da cicatrização regenerativa é provavelmente um resultado de efeitos pleiotrópicos, através da regulação da resposta inflamatória, assume mais de uma função como regulador da matriz extracelular, otimizador da função celular de fibroblastos e de células progenitoras endoteliais (KING, A *et al.*, 2013).

Recentemente, a IL10 foi identificada como um importante fator no desenvolvimento de respostas inflamatórias e imunes envolvidos na patogênese do câncer. A região promotora de IL10 contém vários polimorfismos, o que pode influenciar a expressão do gene *IL10* associado a várias doenças como o câncer (SINUANI, I *et al.*, 2013); (Yu, Z *et al.*, 2013). IL-10 inibe a ativação de macrófagos, esta citocina produção e proliferação de células T específicas de antígeno. Por outro

lado, vários estudos têm postulado o envolvimento de IL-10 no aparecimento e disseminação do adenocarcinoma gástrico

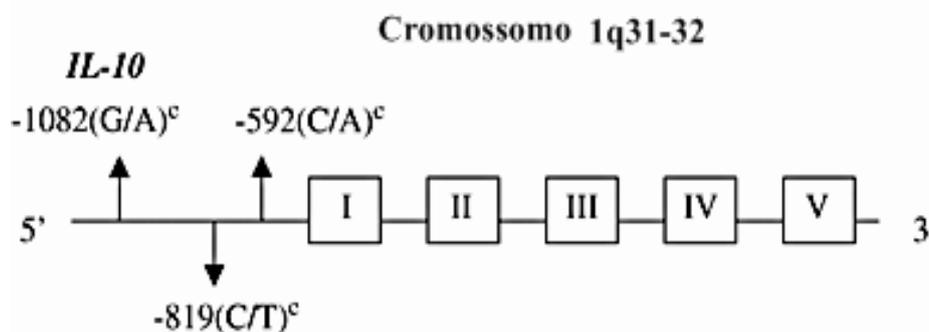
IL-10 inibe a ativação de macrófagos, esta citocina estimula a produção e proliferação de células T específicas dos antígenos. Estudos têm postulado o envolvimento de IL-10 no aparecimento e disseminação do adenocarcinoma gástrico (GARCÍA-GONZÁLEZ, M; NICOLÁS-PÉREZ, D; QUINTERO, E, 2012); (YU, Z *et al.*, 2013).

A expressão da proteína IL-10 pode ser modificada por polimorfismos que alteram o sítio de ligação de fatores de transcrição. Portanto, a identificação de genes candidatos plausíveis a serem excluídos e genes causadores, devem ser investigados cuidadosamente, para que haja resultados confiáveis (HYUN, MH *et al.*, 2013).

Há uma variação significativa na produção de IL-10 entre os indivíduos. Estudos em gêmeos sugerem que até 75% da variabilidade são atribuídas a fatores genéticos. A produção é controlada no nível da transcrição e algumas variações podem ser explicadas por dois polimorfismos (IL-10G e IL-10R) na região promotora. Onze polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) também têm sido descritos na região promotora, dos quais três estão nas proximais 1,3 kb [1082 (G / A), 819 (C / T), 592 (C / A)], e sete na região distal 1,3-4 kb, das quais três [3575 (T / A), 2849 (G / A), 2763 (C / A)] têm frequência alélica igual. (SALIM, P.H; XAVIER, R.M; 2014).

*IL-10<sup>G1082A</sup>/IL10<sup>-C819T</sup>/IL-10<sup>-C592A</sup>*

O gene *IL-10* nos humanos, está localizado no cromossomo 1q31-32. É composto por cinco éxons e quatro íntrons. Os três SNPs mais investigados do gene *IL-10*, na posição -1082 A/G e -819 C/T na região do promotor proximal e na posição -592 A/C- em sua região 5' flanqueadora. O alelo *IL-10<sup>-1082\*</sup>* um dos mais estudados, apresentou o alelo G associado com o aumento da produção de IL-10 (NI, P *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Estrutura do gene e localização dos polimorfismos funcionais em *IL-10*.

Fonte: [http://www.nature.com/gene/journal/v6/n4/fig\\_tab/6364189f1.html](http://www.nature.com/gene/journal/v6/n4/fig_tab/6364189f1.html)

A presença simultânea de três SNPs, posicionados na região promotora -1082G / A -819C / T e -592 A./-C, tem sido relacionados com a produção eficaz de *IL10* (KING, A *et al.*, 2013).

No câncer colorretal, dois SNPs no promotor do gene *IL-10*, rs1800896 (-1082 A> G) e rs1800872 (-592 C> A), foram relatados por estarem associados com diferentes níveis de expressão de *IL-10*. O alelo variante G na região promotora -1082 foi correlacionado com a expressão aumentada desta interleucina, enquanto a variante -592 foi associada com a diminuição da expressão de *IL-10*. Em experimento *in vitro* -A1082G-, -C819T e -A592C -se combinam para formar três haplótipos; GCC, ACC, e ATA, que estão ligadas ao nível de expressão de *IL-10* (Y.M. ZHANG; X.C. ZHOU; Z. XU; C.J. TANG, 2012).

Apenas a substituição de pares de bases C/T foi identificada no promotor na região do gene *IL-10* C<sup>-819T</sup> pares de bases, a montante o local de início da transcrição. Esta substituição de bases foi nomeada -819C/T com rs1800871.

Em 2003, Wu MS *et al.* publicaram pela primeira vez a importância deste alelo *IL10* -819 C/T em associações com a suscetibilidade ao câncer gástrico, apesar de seus resultados serem contraditórios (XUE, H *et al.*, 2012).

Em 2003, El-Omar EM *et al.* e Wu MS *et al.* publicaram simultaneamente um estudo com *IL-10*<sup>-592</sup> A/C sobre associações com a suscetibilidade ao câncer gástrico. (XUE,H, *et al.*, 2012).

### 1.5.3 Interleucina 17 (IL 17)

“IL17 é uma citocina da família de IL17 e é essencialmente produzida a partir de um subconjunto de células efectoras CD4 + conhecidos como Células Th17” (RAFIEI, A *et al.*, 2013).

A descrição da interleucina 17 (IL17) em 1995 e o reconhecimento posterior de células secretoras como um subconjunto distinto chamado Th17, levou a investigação de várias doenças cujas imunopatologias não puderam ser total ou parcialmente atribuídas a células Th1 (NORMANTONI; M; MARTII, L, 2013).

IL17A e IL17F são os membros da família das citocinas IL17, são responsáveis pela atividade patogénica das células Th17, de uma linhagem de células efectoras diferentes de CD4+, além de serem citocinas que induzem múltiplos mediadores pró-inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas e metaloproteínases, a partir de células epiteliais e de fibroblastos (SHIBATA, T *et al.*, 2009).

**Tabela 2.** Descrição de características básicas imunológicas, genética e clínica da IL17.

Citocinas	Fontes	Genes	Polimorfismos	Função	Doenças relacionadas
IL-17 <sup>a</sup>	Células T (Th17)	<i>IL-17A</i> ( <i>rs2275913</i> )	<i>IL-17</i> (G197A)	Citocina pró-inflamatória	↑ risco de câncer gástrico, Asma.
IL-17F	Células T (Th17)	<i>IL-17F</i> ( <i>rs763780</i> )	<i>IL-17F</i> (A7488G)	Citocina pró-inflamatória	↑ risco de câncer gástrico, colite ulcerativa.

As células linfóides (ILCS) IL-17A parecem atuar principalmente sobre as células não hematopoiéticas, tais como células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos, devido à expressão restrita de uma das suas subunidades do receptor de IL-17RC (TSAI, H *et al.*, 2013). Além da patogênese gástrica, a IL-17A e IL-17F foram relatados para desempenhar um papel patogénico em certas doenças auto-imunes, incluindo a esclerose múltipla e a artrite reumatoide.

A importância das células Th17 e interleucina de sinalização IL-17A na defesa do hospedeiro e no desenvolvimento da doença, tem sido demonstrada em vários modelos de infecção e auto-imunes. Dados emergentes em pacientes com câncer sugerem que IL-17F está envolvido na patogênese do tumor. IL-17F foi descrita no câncer do cólon humano. Alguns polimorfismos genéticos de *IL17F* foram associados com o risco de câncer gástrico e câncer de bexiga. Muitas pesquisas sobre a correlação entre os parâmetros clínicos de tumores e níveis de IL-17F no sangue periférico de tecidos de pacientes, revelaram previsões de novas funções terapêuticas de IL-17F nos diferentes tumores (HUICHAO, Y ; TONG, Z. 2012).

Embora o mecanismo subjacente ainda não seja claro, estudos mostraram que polimorfismos genéticos de *IL-17* foram associados com a susceptibilidade a uma gama de doenças relacionadas à inflamação, incluindo artrite reumatóide, colite ulcerativa, câncer gástrico e câncer de mama. No entanto, o papel dos polimorfismos *IL-17* participando na oncogênese do carcinoma do colo do útero permanece desconhecido (QUAN, Y *et al.*, 2013).

*IL17*<sup>G197A</sup> / *IL17F*<sup>A7488G</sup>

Interleucina 17A foi identificada pela primeira vez em células T ativadas em linfoma, em ratos, denominadas CTLA8, e subsequentemente identificada em humanos em 1995. Observou-se que IL-17A tinha uma estrutura única entre as interleucinas citocinas (TSAI, H *et al.*, 2013).

Constitui-se em nova família de citocinas pró-inflamatórias, que consiste de seis membros semelhantes, designadas IL-17A (também anteriormente conhecido como IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, de acordo com a ordem em que foram descobertas. *IL-17A* e *IL-17F* se encontram lado a lado no cromossomo 6 humano, e ambas as citocinas são produzidas por células Th17 em resposta a IL-23 (WANG, L *et al.*, 2012).

Suspeita-se que os polimorfismos no gene da *IL-17A* (rs2275913 G> A) e no gene da *IL-17F* (rs763780 T> C) estejam intimamente associados à susceptibilidade à carcinogênese gástrica e colite ulcerativa (ARISAWA, T *et al.*, 2012).

WU *et al.* 2009, associaram os polimorfismos *IL-17*<sup>G197A</sup> e *IL-17F*<sup>A7488G</sup> aos riscos de câncer gástrico e concluíram a primeira evidência de que o *IL-17F*<sup>A7488G</sup> variante que aumenta o risco de câncer gástrico na população chinesa, de baixo risco. O

Genótipo *IL-17F*<sup>\*7488A</sup> foi associado aos subtipos de características clinico-patológicas de pacientes com câncer gástrico. O polimorfismo *IL17A*<sup>G-1979A</sup> foi associado com aumento do risco de certos subtipos de cancro gástrico, mas não com o risco total de câncer gástrico.

Muitos estudos avaliaram a associação entre o polimorfismo do gene da citocina e a carcinogênese gástrica em pessoas com *H. pylori*. Kawaguchi *et al.* demonstraram que o *IL17F*<sup>7488T/C</sup> (rs763780), provoca uma substituição de His-Arg no aminoácido 161 (H161R), que influencia o risco de asma e é um antagonista natural nos polimorfismos *IL-17F*, conhecidos do gene da *IL-17* (TAHARA *et al.*, 2010).

Recentemente foram descritos as prováveis, funções dos polimorfismos *IL-17A*, *-17F* na inflamação e carcinogênese gástrica (TAHARA *et al.*, 2010). Um particular polimorfismo *IL-17*<sup>G-197A</sup> (rs22759133) também tem sido associado com certos tipos de câncer gástrico nas populações japonesa e chinesa (RAFIEI, A *et al.*, 2013).

Tahara *et al.* (2010) concluíram em seu estudo que *IL-17F* (A7488G) aumenta o risco de câncer gástrico na população chinesa de baixo risco, enquanto o genótipo *IL-17F* G-7488A está associado aos subtipos de características clinico-patológicas dos pacientes com câncer gástrico, incluindo a localização, classificação histológica de Lauren, diferenciação do tumor, estadiamento TNM e idade inicial. O polimorfismo *IL17A*<sup>G-1979A</sup> também está associado ao aumento do risco de certos subtipos de câncer gástrico, mas não com o risco total deste câncer.

## 1.6 Ancestralidade

Cavalli-Sforza e Bodmer (1971) demonstraram que a frequência de algumas variantes genéticas é distinta entre populações e/ou regiões geográficas diferentes, portanto, essas variantes podem ser utilizadas em estimativas de composição ancestral de populações híbridas. A precisão na avaliação da contribuição ancestral numa população é diretamente proporcional à magnitude da diferença das frequências dos marcadores entre as populações ancestrais, variantes com estas características são chamadas de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) (PARRA, E. *et al.*, 1998). A análise destes marcadores é importante para descrição da diversidade genética populacional, reconstrução histórica dos povoamentos (CALLEGARI-JACQUES; SALZANO, 1999; YANAGIHARA *et al.*, 1995) estimativa de contribuição das populações ancestrais na formação de populações miscigenadas (SHRIVER *et al.*, 2003;

PARRA, E., *et al.*, 1998; PARRA, E., *et al.*, 2001; PRITCHARD; DONNELLY, 2001; TSAI *et al.*, 2006) e estudos de mapeamento genético e associação com doenças (SHRIVER, 1997).

Segundo, Vieira, PC e colaboradores (2015) foi encontrada grande associação entre os marcadores de ancestralidade e o desenvolvimento de câncer gástrico, concluíram que existe um alto risco de desenvolvimento em populações com grande miscigenação, como as populações da Amazônia Brasileira. (CARVALHO, DC *et al.*, 2015 ; VIEIRA, PC *et al.*, 2015; LOPES MACIEL, LG *et al.*, 2011; SANTOS, NP *et al.*, 2010).

### 1.7 Aplicabilidades Clínicas

O câncer de estômago é frequente no Brasil, trata-se do segundo tumor mais frequente na região Norte do Brasil, entre os homens (11 casos/100 mil) e Nordeste (10 casos/100 mil). E entre as mulheres é o terceiro mais incidente na Região Norte (6 casos/100 mil) e no Nordeste (6 casos/100 mil) e o quinto no Brasil (INCA, 2013).

Há fortes indícios de que exista uma estreita relação entre o processo inflamatório, os níveis de interleucinas e o câncer de estômago. Sabe-se que a inflamação é um dos processos iniciais da carcinogênese. O crescimento do tumor induz um microambiente inflamatório e células cancerígenas podem aumentar a produção de proteínas inflamatórias, logo, podem servir como potenciais biomarcadores para prever a susceptibilidade ao câncer. (WANG, J *et al.*, 2015).

Inúmeros genes podem estar associados ao câncer gástrico, dos quais citamos os genes envolvidos na inflamação como as citocinas que parecem exercer um papel importante neste processo. No presente, propomos uma investigação de seis genes e seus polimorfismos: *IL17<sup>G-197A</sup>*, *IL 17F<sup>A7488G</sup>*, *TNF $\alpha$ <sup>G-308A</sup>*, *IL10<sup>G-1082A</sup>*, *IL10<sup>C-819T</sup>* e *IL10<sup>C-592A</sup>*, que podem estar envolvidos como marcadores de predisposição e desenvolvimento do câncer gástrico.

O foco no incentivo à pesquisa oncológica é relevante face às estimativas da UICC (União Internacional contra o Câncer) para um aumento de 50% até 2020 no número de casos novos de câncer e o dobro do número de mortes. No Brasil, esse desafio é maior porque temos uma sobrevida em câncer em torno de 2 a 4 anos, enquanto em países desenvolvidos este índice é de 12 a 16 anos (INCA, 2013).

O câncer precisa ser tratado como problema de saúde pública, a relação entre a inflamação e o processo de tumorigênese ainda é obscura, os dados bibliográficos em relação a este assunto são escassos, sendo primordial a iniciativa para novas pesquisas a fim de esclarecimento e detecção prematura da doença, assim como também o risco a que o indivíduo está exposto.

Estudar os polimorfismos de genes de citocinas envolvidos no processo inflamatório gástrico se faz necessário, para definir se pode existir influência destes polimorfismos na patogenia do câncer gástrico e de que maneira o processo de carcinogênese é influenciado (considerando estudos que indicam que estes polimorfismos têm exercido grande influência neste processo em algumas populações). Poucos estudos relacionados ao CG e citocinas foram realizados nesta região do país, onde as estatísticas mostram elevada incidência.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Investigar associação de polimorfismos dos genes das interleucina *IL17*, *TNF- $\alpha$* , *IL10* na patogenia do câncer gástrico.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- Identificar por meio da discriminação alélica seis polimorfismos *IL17<sup>G-197A</sup>*, *IL17F<sup>A7488G</sup>*, *TNF $\alpha$ <sup>G-308A</sup>*, *IL10<sup>G-1082A</sup>*, *IL10<sup>C-819T</sup>* e *IL10<sup>C-592A</sup>*, em amostras de pacientes com câncer gástrico e sem câncer.;
- Investigar e comparar a distribuição de marcadores informativos de ancestralidade (*AIM*) em amostras de pacientes com câncer e indivíduos sem câncer gástrico;
- Comparar os padrões genotípicos e haplotípicos dos polimorfismos presentes nos genes das citocinas, em amostras de pacientes com câncer gástrico e indivíduos sem câncer;
- Comparar os padrões genotípicos e haplotípicos dos polimorfismos das amostras deste estudo com os dados descritos na literatura

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

O presente estudo trata-se do tipo caso-controle. Foram recrutados para o estudo um total de 200 indivíduos, 100 pacientes diagnosticados com câncer gástrico e 100 indivíduos sem câncer. Todas as amostras investigadas foram provenientes de sangue periférico de indivíduos residentes em Belém (PA). Todos os pacientes participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1). Foram excluídos os pacientes que não concordaram com o estudo.

O estudo foi previamente autorizado pela coordenação acadêmica do HUIBB e obedecerá à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa com seres humanos. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 653.354, no dia 27/05/2014.

#### 3.2 Coleta de Amostras e a Extração do DNA

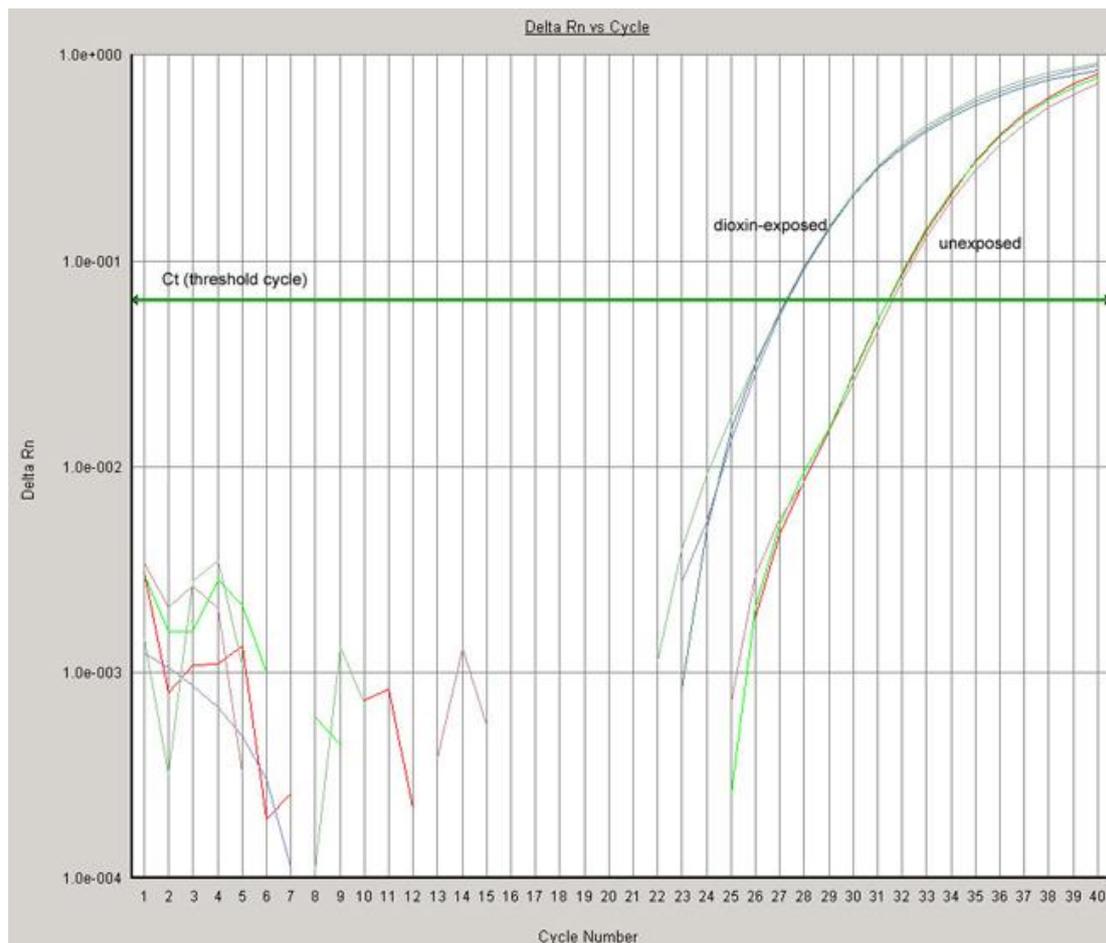
As amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON/HUIBB-UFPA).

O material genético dos participantes do estudo, casos e controles, foi coletado a partir de 5 mL de sangue periférico, utilizando EDTA como anticoagulante. A extração do DNA foi realizada a partir de 200 µL de sangue periférico com kit comercial de DNA da Roche (©Roche Diagnostics). A concentração do DNA foi estimada empregando um espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Posteriormente, o DNA foi armazenado no freezer -80°C no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da UFPA.

#### 3.3 Genotipagem e análise de dados

Os seis SNPs dos genes das interleucinas *IL17*<sup>G-197A</sup>, *IL 17F*<sup>A7488G</sup>, *TNFα*<sup>G-308A</sup>, *IL10*<sup>G-1082A</sup>, *IL10*<sup>C-819T</sup> e *IL10*<sup>C-592A</sup> foram genotipados com sondas marcadas com os fluoróforos VIC/FAM (Real Time PCR, Life Technologies, CA, USA). Todas as amostras foram genotipadas de acordo com as recomendações dos protocolos do fabricante.

A análise molecular dos seis polimorfismos dos genes das interleucina  $IL17^G-197A$ ,  $IL17F^{A7488G}$ ,  $TNF\alpha^{G-308A}$ ,  $IL10^{G-1082A}$ ,  $IL10^{C-819T}$  e  $IL10^{C-592A}$  foi realizada por PCR em Tempo Real com sondas *TaqMan*® (*Applied Biosystems*®, *Foster City, Califórnia, EUA*) utilizando o equipamento *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). A Figura 7 representa a detecção e amplificação de uma sonda *TaqMan*. O protocolo utilizou 3.5  $\mu$ L de Master Mix, 0.157  $\mu$ L de sonda *TaqMan*, 3.325  $\mu$ L de água e 1.0  $\mu$ L de DNA. O mix final foi amplificado com o seguinte programa: 10' a 95°C, 40 ciclos de 15" a 92°C, e 1' a 60°C.



**Figura 7.** Representação gráfica do processo de detecção e amplificação de sonda *TaqMan* específica e seu controle endógeno pela metodologia de “discriminação alélica” na plataforma *7500 Real-Time PCR* (*Life Technologies*), no exemplo, detecta-se um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo, onde a sonda FAM corresponde ao alelo selvagem e a sonda VIC ao alelo mutante.

### 3.4 Análise estatística

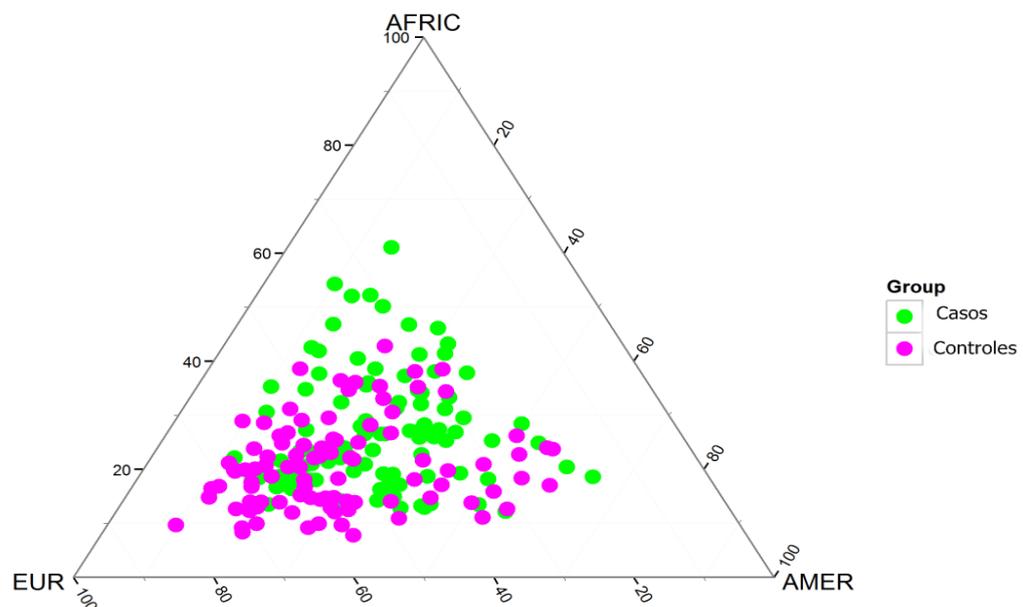
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas SPSS v. 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) e R v.3.2.1. Para comparar as variáveis categóricas (gênero) foi utilizado o teste exato de Fisher, o teste T de *Student's* foi usado para variáveis quantitativas (idade). Para comparar a ancestralidade genética entre os grupos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. O *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) para polimorfismos avaliados foram calculados por meio de regressão logística múltipla, controlando os dados para idade, sexo e etnicidade genética. Todos os testes estatísticos foram baseados em uma probabilidade bilateral e um P-valor  $\leq 0,05$  foi adotado como critério de significância. Valores de P para comparações múltiplas foram corrigidas pelo método de Bonferroni.

### 3.5 Ancestralidade

As análises de ancestralidade foram realizadas conforme descrito por Santos et al., (2010) utilizando 48 marcadores informativos de ancestralidade (*AIMs*). Três reações de PCR multiplex com 16 marcadores de cada um foram realizadas, e os produtos de amplificação de PCR foram analisados por eletroforese utilizando o sequenciador *ABI Prism 3130* e software v.3.2 *GeneMapper ID*. As proporções de ancestralidade individuais de Europeu, Africano e Ameríndio, foram estimadas usando software *STRUCTURE* v.2.3.3, assumindo três populações parentais (Europeu, Africano e Ameríndio). O software *STRAT* version 1.01 (Setembro, 2002) foi empregado nas análises de associação entre casos e controles assumindo 10.000 simulações. O *STRAT* utiliza o output do software *STRUCTURE* para testar a associação na presença de estratificação na população com base na informação da ancestralidade do indivíduo.

#### 4. RESULTADOS

A Figura 8 mostra estimativas da composição interétnicas entre os indivíduos dos grupos caso e controle. Do ponto de vista da ancestralidade, observou-se que a composição étnica do grupo com câncer foi de 27% africano, 42% europeu, e 31% de ameríndia. No grupo sem câncer, a composição foi de 21 % africano, 52% europeia, e 27% de ameríndia. De forma independente, nos dois grupos a proporção de genes europeus foi maior com relação aos outros grupos étnicos. A maior contribuição foi observada no grupo controle. Enquanto a proporção de genes Africanos foi maior no grupo caso. As diferenças das composições para as três ancestralidades, entre os dois grupos, foram estatisticamente significantes (Tabela 3).



**Figura 8.** Representação da miscigenação dos grupos estudados. Cada indivíduo é representado por um ponto colorido e sua localização no gráfico corresponde ao seu valor de proporção das ancestralidades. Os vértices mostram as etnicidades europeia, africana, e ameríndia. Pacientes do grupo caso estão representados na cor verde e controles na cor rosa.

A Tabela 3 mostra as análises das variáveis clínicas e demográficas entre os grupos caso (câncer gástrico) e controle (sem câncer), na qual a média de idade do grupo caso ( $51,76 \pm 19,58$ ) foi maior do que a do grupo controle ( $23,06 \pm 4,86$ ), com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Com relação a distribuição do gênero, o grupo caso tem predominância de indivíduos do gênero masculino em relação ao

controle (62 vs 46, respectivamente), o inverso foi verdadeiro para o gênero feminino, com diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

**TABELA 3.** Variáveis clínicas e demográficas comparadas entre os grupos caso de câncer gástrico e controle fenotipicamente normais.

Variáveis	Caso n=100 (Média)	Cont. n=100 (Média)	P-valor
	± DP <sup>a</sup>	± DP <sup>a</sup>	
Idade, anos <sup>b</sup>	51,76±19.58	23,06±4.86	<b>&lt;0,001</b>
Gênero (Masculino/Feminino) <sup>c</sup>	62/22	46/53	<b>&lt;0,001</b>
<b>Ancestralidade Genética</b>			
Etnicidade Européia <sup>d</sup>	0,4246	0,5187	<b>1,0e-6</b>
Etnicidade Africana <sup>d</sup>	0,2726	0,2067	<b>1,1e-5</b>
Etnicidade Ameríndia <sup>d</sup>	0,3026	0,2746	<b>0,028</b>

a DP = desvio padrão.

b Significância determinada pelo teste t de Student.

c Significância determinada pelo teste exato de Fisher.

d. Significância determinada pelo teste de Mann-Whitney.

A Tabela 4 mostra a distribuição dos haplótipos relacionados com o gene *IL10* para os SNPs rs1800896 [A-1082G], rs1800871 [C-819T], rs1800872 [C-592A]. No geral sete haplótipos foram observados nas duas populações do estudo, os mais frequentes no grupo controle foram os haplótipos ACC (37%) seguido do ATC e GCA, ambos com 28%. No grupo caso os haplótipos mais frequentes foram GCA (29%), ACC (19%) e GCC (21%). A frequência dos haplótipos que conferem elevada produção de IL-10 (GCC, GCA, GTC, GTA) foi maior no grupo caso (58%), em relação aos controles (34%). Assim a presença dos haplótipos de elevada produção foram associados como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico ( $p = 1,15 \times 10^{-11}$ ; OR=2,630; IC 95%=2,116-3,271). Para corrigir esta associação, afim de evitar erros espúrios ocasionados pela subestruturação populacional, foi realizado o mesmo ensaio no software STRAT, o qual apontou uma diferença estatística similar para a análise de regressão logística, desta maneira reafirmando a hipótese acima. ( $p = 1,1 \times 10^{-9}$ ).

**TABELA 4.** Frequência dos haplótipos do gene *IL-10* em casos e controles.

SNP			Frequência dos haplótipos				
A-1082G	C-819T	C-592A	Caso	Controle	<i>P</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p<sub>strat</sub></i>
A	C	C	<b>0,19</b>	<b>0,370</b>			
A	C	A <sup>a</sup>	<b>0,07</b>	<b>0,014</b>			
A	T	C	<b>0,128</b>	<b>0,276</b>		<b>1</b>	<b>1,1E-9</b>
G	C	C	<b>0,207</b>	<b>0,042</b>	<b>1,15E-11</b>	<b>2,6 (2,1-3,2)</b>	
G	C	A	<b>0,289</b>	<b>0,279</b>			
G	T	C	<b>0,079</b>	<b>0,011</b>			
G	T	A	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>			

<sup>a</sup> Alelos mutantes demonstrados em negrito.

A Tabela 5 resume a distribuição dos genótipos/fenótipos e perfis de produção de IL-10, com suas respectivas frequências e múltiplas análises. Quando comparado os dois grupos, observamos elevada frequência (44%) de fenótipos de **baixa produção** no grupo controle, contra 2% no grupo caso. Quanto aos fenótipos de **produção intermediária**, o grupo caso obteve o dobro da frequência do grupo controle (82% vs 44). Para os fenótipos de **alta produção**, o grupo caso apresentou frequência de 16%, enquanto que o grupo controle apresentou frequência de 12%. Ao analisarmos em conjunto, os fenótipos de **intermediária e alta produção**, uma elevada concentração do grupo caso (98% de seus indivíduos) em relação ao controle (56% de seus indivíduos).

Entre os haplótipos que estão associados com **baixa produção** de IL-10, entre os grupos caso e controle, destacam-se: **ACC/ACC** (0% vs 15%), **ACC/ATC** (1% vs 15%), e **ATC/ATC** (0% vs 13%), com frequências elevadas no grupo controle. Para os fenótipos que caracterizam **produção intermediária** de IL-10, entre os grupos caso e controle, destacam-se: **GCC/ACC** (15% vs 4%) e **GCC/ATC** (14% vs 2%), com frequências elevadas no grupo caso, sendo o inverso para o encontrado nos fenótipos de baixa produção. Os fenótipos **GCC/GCC** descritos como relacionados à **alta produção** de IL-10 apresentaram maior frequência em indivíduos portadores do câncer gástrico, porém com pequenas diferenças na distribuição das frequências dos genótipos.

O perfil de baixa produção parece estar associado a um fator de proteção contra o câncer gástrico, uma vez que os perfis de alta e intermediária produção são elevados entre os indivíduos portadores de câncer gástrico. O teste de associação realizado para os genótipos de *IL-10*, entre caso e controle mostrou que a presença dos haplótipos de **alta produção** (fenótipo de média + fenótipo de alta), são fatores de risco ao desenvolvimento do câncer gástrico ( $p=5.67e-08$ ;  $OR=38.4$ ,  $IC95\%$  [11.289-41.570]). Para corrigir esta associação, a fim de evitar erros espúrios ocasionados pela subestruturação populacional, foi realizado o mesmo ensaio no software STRAT, o qual apontou uma diferença estatística similar para a análise de regressão logística, desta maneira reafirmando a hipótese acima. ( $P=1,1E-9$ ).

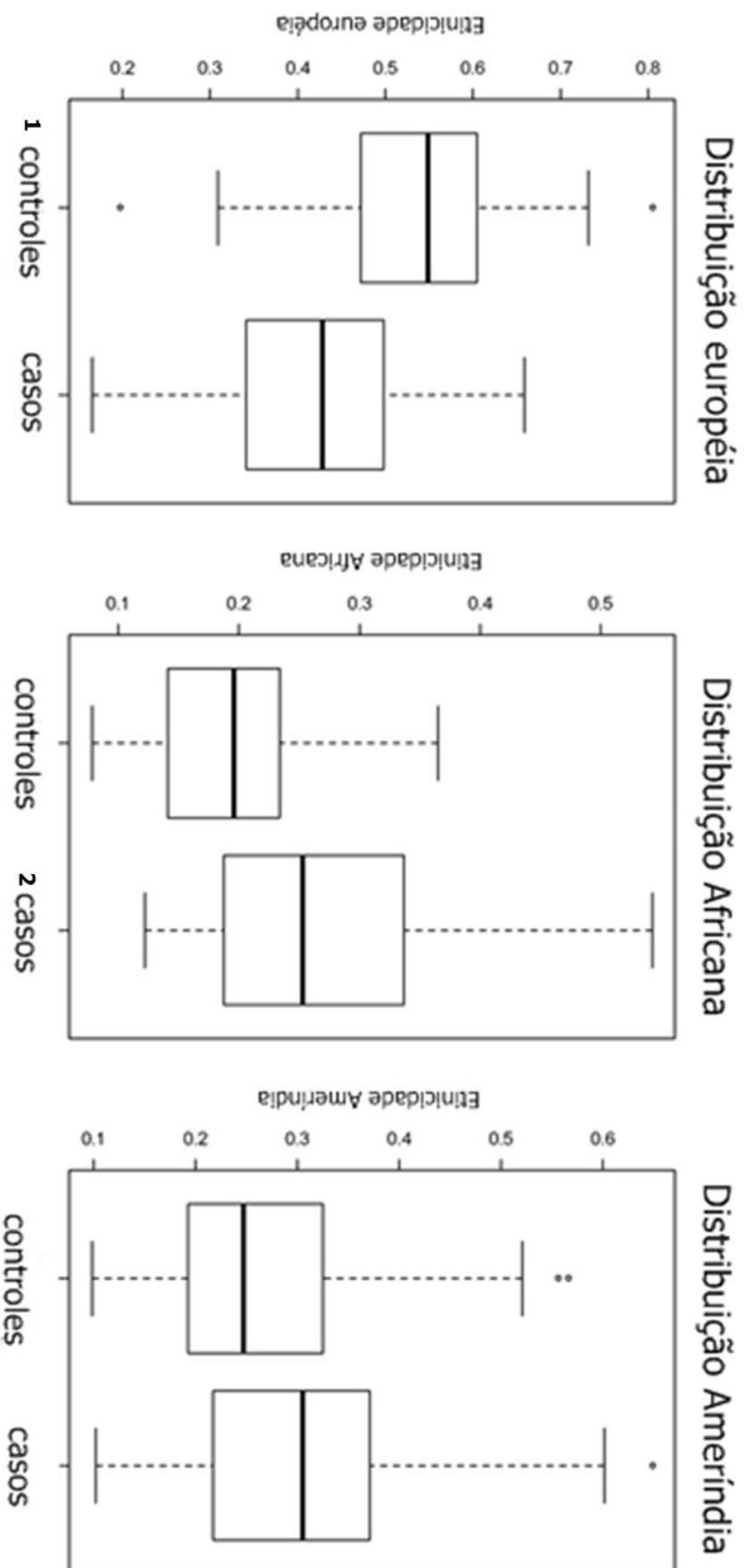
**TABELA 5.** Análise dos haplótipos e fenótipos quanto a produção de IL-10 em casos e controles.

Genótipo/Perfil de produção de IL-10	No. (%)	
	Caso	Controle
<b>Baixa produção</b>	<b>2</b>	<b>44</b>
ACC/ACC	0	15 (15)
ACC/ACA	1(1)	0
ACC/ATC	1(1)	15 (15)
ACA/ACA	0	1 (1)
ATC/ATC	0	13 (13)
<b>Produção intermediária</b>	<b>82</b>	<b>44</b>
GCC/ACC	15 (15)	4(4)
GCC/ATC	14 (14)	2(2)
GCA/ACC	32 (32)	26(26)
GCA/ACA	3 (3)	0
GCA/ATC	13 (13)	11 (11)
GTC/ATC	5(5)	1 (1)
<b>Alta produção</b>	<b>16</b>	<b>12</b>
GCC/GCC	3 (3)	0
GCC/GCA	1 (1)	1 (1)
GCC/GTC	2 (2)	0
GCA/GCA	10 (10)	10 (10)
GCA/GTA	0	1 (1)

<sup>1</sup> Haplótipos de alta produção p=5.67e-08 ; OR=38; IC95% [11.289-41.570]

<sup>2</sup> Valor de p<sup>strat</sup> : P=1,1E-9

A Figura 2 mostra o Box-Plot entre os grupos estudados, considerando a distribuição das frequências haplotípicas e de ancestralidade, entre os indivíduos com fenótipos de média e alta produção de IL-10 (estes apresentam fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico). Em relação aos genótipos relacionados com alta e média produção, nos dois grupos, a ancestralidade europeia foi significativamente maior no grupo controle em relação ao grupo caso ( $p=1E-06$ ). De maneira inversa, a ancestralidade africana foi maior no grupo caso em relação ao grupo controle ( $p=1.4E-5$ ). Não foram encontrados resultados significativos, no que diz respeito aos perfis de alta produção de IL-10 relacionados a ancestralidade ameríndia entre os grupos caso e controle.



**Figura 9.** Box-Plot entre os grupos estudados, Considerando as distribuições das frequências das ancestralidades entre os fenótipos de média e alta produção de IL-10.

<sup>1</sup> P valor para distribuição de ancestralidade Africana p = 1E-06

P valor para distribuição de ancestralidade Européia p = 1.4 E-5

\* Realizada correção de Bonferroni

Tabela 6 resume a distribuição genotípica de polimorfismos dos genes *TNF- $\alpha$* , *IL-17A* e *IL17F* investigados nas amostras de casos e controles. Para o gene *TNF- $\alpha$*  foram genotipados 99 pacientes do grupo caso e 98 do grupo controle. Os genótipos *TNF- $\alpha$*  GA e *TNF- $\alpha$*  AA apresentaram maior frequência em pacientes do grupo caso (GA=29.3% /AA=33.3%). Adicionalmente, realizou-se análise estatística complementar dos mesmos genótipos em relação ao seu alelo dominante (AA+GA). A presença do alelo *TNF- $\alpha$* \*A determinou fator de risco aumentado, em 10 vezes, em relação ao grupo controle (P <000.1; OR 10.375; IC 95% 3.149- 34.061). O valor de P considerado foi <0.001.

O gene *IL17A* apresentou frequências genotípicas de *IL17A* GG, *IL17A* GA, e *IL17A* AA distribuídas de forma equilibrada entre os grupos caso e controle (p = 0.395), foi demonstrado valor de OR (Odis Ratio) de 0.435.

O gene *IL-17F* também apresentou frequências genotípicas equiparadas entre *IL-17F* TT e *IL-17F* TC entre os grupos casos e controles, não apresentando por sua vez significância estatística na análise.

**TABELA 6.** Distribuição genotípica de polimorfismos dos genes *TNF- $\alpha$* , *IL-17A*, *IL17F* investigados em casos e controles.

SNP	No.(%)		P-valor <sup>a</sup>	OR (95% CI) <sup>a</sup>
	Caso	Controle		
<b>TNF-<math>\alpha</math> (G-308A)</b>	<b>99</b>	<b>98</b>		
GG	37 (37,4)	84 (85,7)		1
GA	29 (29,3)	14 (14,3)		
AA	33 (33,3)	0		
AA+GA			<b>&lt;0,001</b>	10,375 (3,149-34,061)
Alelo G	0,52	0,93		
Alelo A	0,48	0,07		
<b>IL17A</b>	<b>95</b>	<b>85</b>		
GG	66 (69,4)	51 (60)		1
GA	24 (25,3)	28 (28)		
AA	5 (5,3)	6 (7,1)	0,395	0,435 (0,064-2,961)
Alelo G	0,82	0,76		
Alelo A	0,18	0,24		
<b>IL17F</b>	<b>100</b>	<b>100</b>		
TT	96 (96)	91 (91)		
TC	4 (4)	9 (9)		
Alelo T	0,98	0,95		
Alelo C	0,02	0,05		

<sup>a</sup>Regressão logística múltipla ajustada para as variáveis independentes, idade, gênero e etnia

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi relacionado a presença de distintos polimorfismos de genes de interleucinas,  $TNF\alpha^{G-308A}$ ,  $IL10^{G-1082A}$ ,  $IL10^{C-819T}$ ,  $IL10^{C-592A}$  e  $IL17^{G-197A}$ ,  $IL17^{A7488G}$ , entre amostras de pacientes com câncer gástrico e sem câncer gástrico.

LEAL e colaboradores (2012) investigaram amostras de Câncer gástrico no norte do Brasil, demonstraram que esta é a segunda neoplasia mais frequente entre os homens e a terceira entre as mulheres. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) confirma que pico de incidência se dá em sua maioria em homens, onde 65% dos pacientes diagnosticados com câncer de estômago apresentam mais de 50 anos. Esses dados justificam os nossos resultados.

Em relação ao conjunto de marcadores da interleucina IL-10 ( $IL10^{G-1082A}$ ,  $IL10^{C-819T}$ ,  $IL10^{C-592A}$ ), observou-se que a distribuição haplotípica que está relacionada a elevada expressão desta interleucina foi mais frequente no grupo de pacientes com câncer gástrico, quando comparado ao grupo sem câncer. Estudos já demonstraram, através de experimento *in vitro* sob estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) ou concanavalina A (ConA), para outras doenças inflamatórias e auto imunes, que os haplótipos de *IL-10* iniciados por G (Guanina) localizados na região promotora do gene, representam alta produção desta interleucina, bem como haplótipos iniciados por adenina (A) representam baixa produção. Nossos resultados sugerem que exista associação entre a presença destes haplótipos e a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer gástrico. (TIMMANN *et al.*, 2014; ESKDALE, *et al.*, 1999; CRAWLEY *et al.*, 1999)

A incidência de infecção por *H.Pylori* é elevada no estado do Pará (INCA, 2016; VINAGRE *et al.*, 2013; JÚNIOR *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014), o que pode justificar altos níveis de IL-10 encontrados em pacientes do grupo caso. O processo inflamatório crônico a longo prazo, associado a esta bactéria, está fortemente relacionado a alta produção de IL-10, produzindo óxido nítrico, que age como mediador de processos inflamatórios e está envolvido no desligamento do sistema imune, que sua vez induz a produção de outras espécies reativas de oxigênio, podendo fosforilar vias importantes responsáveis pela reparação do DNA, estimulando a indução de angiogênese, causando estimulação de fatores de crescimento e silenciamento de genes supressores de tumor, entre outras características importantes do processo carcinogênico. (VALENZUELA, M *et al.*, 2015; HANDA, O;

NAITO, Y; YOSHIKAWA, T. 2010; Davies, G.R *et al.*, 1994; FERNANDES, J.V *et al.*, 2015; EL-OMAR, EM *et al.*, 2000)

Outros estudos também encontraram resultados concordantes em relação à investigação da região promotora do gene da *IL10*, dentre estes GARCIA, P e colaboradores (2013), que relacionaram a mesma região promotora ao risco de desenvolvimento da hanseníase, constatando que haplótipos que representam elevada produção, estão relacionados às formas mais agressivas da doença. Liu *et al.* (2011) e Zeng *et al.* (2012) investigaram a região promotora de *IL-10* relacionada ao CG e demonstraram que os haplótipos que representam elevada produção estão relacionados ao maior risco de desenvolvimento do câncer gástrico e pior prognóstico dos pacientes.

Considerando os resultados de distribuição do perfil de ancestralidade observado nas amostras de câncer gástrico do presente estudo, todos os resultados de associação foram corrigidos em função da observação da subestruturação presente, por meio do software STRAT. Os resultados desta análise confirmaram o efeito de associação genética ( $p=1,1 \text{ E-}9$ ), assim como os dos testes de regressão logística binária, que reafirmaram os genótipos ligados com alta produção de IL-10 (GCC/GCC, GCC/GCA, GCC/GTC, GCA/GCA, GCA/GTA) como fator de risco ao câncer gástrico ( $p=1,15\text{E-}11$ ; OR=2,630; IC 95%=2,116-3,271). Em contrapartida, os genótipos associados à baixa produção de IL-10 (ACC/ACC, ACC/ACA, ACC/ATC, ACA/ACA, ATC/ATC) foram significativos no grupo de amostras controle. Este resultado sugere que estes genótipos estão associados a um fator de proteção contra o câncer gástrico. ZHANG, Q e colaboradores (2014) afirmaram que IL10 tem atividade anti-inflamatória importante por um longo período de tempo, e por isso, apresenta-se como supressor endógeno importante na infecção *in vivo*.

Ao analisar aqueles indivíduos que possuíam o genótipo relacionado com a elevada produção de IL-10, foi demonstrado maior frequência da ancestralidade europeia no grupo de indivíduos controle ( $p=1\text{E-}06$ ), enquanto no grupo de pacientes com CG observou-se significativa frequência da ancestralidade africana ( $p=1.4 \text{ E-}5$ ). Nossos resultados corroboram aos de ZABALETA e colaboradores (2014) que em estudo de susceptibilidade ao CG abordaram distintas interleucinas, entre as quais a IL-10 e seus haplótipos, encontraram maior frequência de ancestralidade africana no grupo de pacientes com CG. Segundo a pesquisa, para explorar plenamente mapas de alta densidade, pode ser mais útil se concentrar na transmissão dos multilocus de haplótipos, ao contrário de alelos em *loci* individuais, uma vez que cada novo

alelo está associado com a sua história cromossômica, a análise de haplótipos com base exclusiva pode detectar segmentos cromossômicos que abrigam alelos-predisponentes da doença.

Em relação a história cromossômica, RIBEIRO-DOS-SANTOS e colaboradores (2007) relatam que antes da chegada dos conquistadores europeus, aproximadamente 2,5 milhões de nativos ameríndios viviam no Brasil, e durante este processo de imigração nos três primeiros séculos, aproximadamente 500.000 pessoas vieram de Portugal e aproximadamente 3,5 milhões de africanos foram trazidos para o Brasil através do comércio de escravos. Mediante a isso, percebemos a necessidade de considerarmos o processo de mistura interétnica no Brasil para melhor entendimento dos mecanismos de adoecimento da população. ( SANTOS, NPC *et al.*, 2010; PINTO, P *et al.*, 2015; LASTÓRIA, JC, ABREU, MAMM. 2014).

Nossos resultados demonstram potencial influência da estrutura da população, o que evidencia a importância para correção e identificação deste problema, em particular em estudos de associação, especialmente em populações altamente miscigenadas como a população da Amazônia brasileira, sendo demonstrado anteriormente pelos autores VIEIRA, P.C.M *et al.*, 2012; GARCIA, P *et al.*, 2013, Carvalho, D.C *et al.*, 2015, OLIVEIRA, C.J *et al.*, 2015.e SANTOS, N.P *et al.*, 2010; PINTO, P *et al.*, 2015.

. Segundo Oliveira e colaboradores (2015), em um estudo realizado com 207 pacientes com câncer gástrico confirmados (segundo classificação de Lauren) que analisaram associações entre o SNP TNF- $\alpha$ -308 G/A .TNF- $\alpha$  tem sido reconhecido como uma importante componente no desenvolvimento da inflamação e carcinogênese gástrica. Esta citocina é reconhecida como das mais importantes pró-inflamatórias envolvidas no crescimento, diferenciação, sobrevivência e função celular de muitas células. Produzida por diversos tipos de células, tais como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células NK (*Natural Killers*), células T e B e células do tumor. TNF- $\alpha$  tem sido relatada a desempenhar um papel importante na patogênese do câncer, outras associações entre a presença dos polimorfismos  $TNF\alpha^{G-308A}$ , no gene *TNF- $\alpha$*  e fatores de risco ao desenvolvimento do câncer gástrico foram realizadas. Segundo CHIURILLO e colaboradores (2014), polimorfismos em genes de citocinas quando relacionados ao processo inflamatório, exercem desregulação da produção de citocinas e são considerados importantes na primeira etapa da fase pré-cancerosa (YU, T *et al.*, 2014; OLIVEIRA, C.J *et al.*, 2015; YANG, JP *et al.*, 2014; BHAYAL, A.C *et al.*, 2013 ).

Estes dados são corroborados por uma metanálise realizada por GUO e colaboradores (2013) em mais de 58 estudos do tipo caso-controle que exploraram a associação entre os polimorfismos observados pelo gene *TNF- $\alpha$*  e o risco do desenvolvimento do câncer gástrico. De fato, os resultados da grande maioria dos trabalhos encontraram associação significativa (CHUNG, H.W; LIM, J.B.2014; BHAYAL, A.C *et al.*,2013 ; YANG, JP *et al.*, 2014). Nesta análise encontramos para população estudada, um risco de maior susceptibilidade do desenvolvimento do câncer gástrico quase 10 vezes maior para os pacientes do grupo caso que apresentaram genótipos *TNF- $\alpha$*  AA e *TNF- $\alpha$*  AG para mutação no gene *TNF- $\alpha$* , resultado que corrobora com a pesquisa de YU e colaboradores (2014), a qual analisou os polimorfismos *TNF- $\alpha$* <sup>308A</sup> para os mesmos genótipos, associando ambos a susceptibilidade ao CG.

No que diz respeito a interleucina IL-17, sabe-se que a mesma pode promover a expressão de peptídeos antimicrobianos e desta forma facilitar a defesa do hospedeiro contra infecções. O polimorfismo de *IL-17A* rs2275913G> A localizado na região 5' próximo ao gene de *IL-17A* pode regular a transcrição do gene (HOU, C; YANG.F. 2015). Estudos anteriores mostraram que polimorfismos nos genes *IL-17A* rs2275913G> A e *IL17F* (rs763780 T> C) estão intimamente associados à susceptibilidade de câncer gástrico. (LONG, ZW *et al.*,2015); (HOU, C; YANG.F. 2015); (NIU,Y.N; YUAN, H; ZHOU, W. 2014); (WU, X *et al.*, 2014). Porém, nosso estudo não encontrou associação significativa entre os polimorfismos do gene *IL-17A* e *IL-17F* e o risco do desenvolvimento de CG na população estudada (p=0,395).

Poucos são os estudos já conduzidos com a IL-17 em amostras populacionais. A literatura atual não apresenta, até o momento, estudos que tenham associado os polimorfismos *IL-17A* rs2275913G> A e *IL17F* (rs763780 T> C) ao risco de câncer gástrico em populações brasileiras, incluindo as da região Amazônica.

## 6. CONCLUSÃO

Ao investigarmos e compararmos os marcadores informativos de ancestralidade (*AIM*) nas amostras observou-se que de forma independente, a proporção de europeus foi maior nos dois grupos, no entanto uma maior contribuição foi observada no grupo controle.

Como descrito pela literatura, encontramos elevada incidência de câncer gástrico no grupo de pacientes que apresentavam maior faixa etária ( $51,76 \pm 19,58$ ) e de gênero masculino (62/22).

Em relação ao conjunto de marcadores da interleucina IL-10 (*IL10<sup>G-1082A</sup>*, *IL10<sup>C-819T</sup>*, *IL10<sup>C-592A</sup>*), observamos que a distribuição haplotípica, quando relacionada a elevada expressão desta interleucina, foi mais frequente no grupo de pacientes com câncer gástrico. Sugerindo que exista possível associação entre a presença de haplótipos de alta produção e o risco de desenvolvimento do câncer gástrico.

Ao analisarmos aqueles indivíduos que possuíam o genótipo relacionado com a elevada produção de IL-10, foi demonstrado maior frequência da ancestralidade europeia no grupo de indivíduos controle ( $p=1E-06$ ), enquanto no grupo de pacientes com câncer observou-se significativa frequência da ancestralidade africana ( $p=1.4E-5$ ).

Quando comparamos os padrões genotípicos para população estudada, observamos que pacientes que apresentaram genótipos *TNF- $\alpha$*  AA e *TNF- $\alpha$*  AG para mutação no gene *TNF- $\alpha$* , apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer.

Este estudo não encontrou associação significativa entre os polimorfismos dos genes *IL-17A* e *IL-17F* e o risco de desenvolvimento para o CG na população estudada.

Concluimos que os polimorfismos na região promotora do gene *IL-10* podem influenciar os níveis de produção desta interleucina, promovendo aumento da susceptibilidade no desenvolvimento do câncer gástrico, principalmente se associados a uma maior contribuição da ancestralidade africana.

Por fim, existe potencial influência da desestruturação da população nestes resultados, destacamos a importância para correção e identificação deste problema, em particular em estudos de associação, especialmente em populações altamente miscigenadas como a população da Amazônia brasileira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.

ARISAWAA, Tomiyasu.; TAHARAB, Tomomitsu.; SHIROEDAA, Hisakazu.; MATSUEA, Yasuhito.; MINATOA, Takahiro.; NOMURAA, Tomoe.; Hideto.; Ranji.; HAYASHIA.; SAITOA, Takashi.; Kazuhiro.; Tomoki FUKUYAMAA.; HAYASHIA, Nobuhiko.; OTSUKAA, Toshimi.; FUKUMURAA, Atsushi.; Masakatsu, NAKAMURAA.; SHIBATAB, Tomoyuki. Genetic polymorphisms of IL17A and pri-microRNA-938, targeting IL17A 3'-UTR, influence susceptibility to gastric cancer. **Human immunology**, v. 73, n. 7, p. 747-752, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CÂNCER. **Câncer gástrico ou de estômago - o que é.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>> Acesso em: 06 Fev. 2014.

ASSUMPÇÃO, Mônica Baraúna.; MARTINS, Luisa Caricio.; BARBOSA, Hivana Patricia Melo.; BARILE, Katarine Antonia dos Santos.; ALMEIDA, Sintia Silva de.; ASSUMPÇÃO, Paulo Pimentel.; CORVELO, Tereza Cristina de Oliveira. Helicobacter pylori in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 24, p. 3033-3039, 2010.

BAG, A.; JYALA, N. S.; BAG, N. **Indian studies on genetic polymorphisms and cancer risk**. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842182>>. Acesso em: 21 Fev. 2014.

BHAYAL, A. C., KRISHNAVENI, D., RANGARAO, K. P., BOGADI, V., SUMAN, C., JYOTHY, A., & VENKATESHWARI, A. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$ -308 G/A promoter polymorphism in gastric cancer. **Saudi Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 4, p. 182, 2013.

BODMER, Walter F.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; HENDRICKSON, A. E. Fear of enlightenment. **Nature**, v. 229, n. 5279, p. 71, 1971.

BONOMI, M., PATSIAS, A., POSNER, M., & SIKORA, A. The role of inflammation in head and neck cancer. In: **Inflammation and Cancer**. Springer Basel, p. 107-127, 2014.

CALABRESE, Leonard H.; ROSE-JOHN, Stefan. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 12, p. 720-727, 2014.

CALLEGARI-JACQUES, S. M., GRATTAPAGLIA, D., SALZANO, F. M., SALAMONI, S. P., CROSSETTI, S. G., FERREIRA, M. E., & HUTZ, M. H. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, n. 6, p. 824-834, 2003.

CARVALHO, D. C., WANDERLEY, A. V., AMADOR, M. A., FERNANDES, M. R., CAVALCANTE, G. C., PANTOJA, K. B., ... & SANTOS, S. Amerindian genetic ancestry and INDEL polymorphisms associated with susceptibility of childhood B-cell Leukemia in an admixed population from the Brazilian Amazon. **Leukemia research**, v. 39, n. 11, p. 1239-1245, 2015.

CÉSAR, Ana Cristina Gobbo; SILVA, Ana Elizabete; TAJARA, Eloiza Helena. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. **Arquivos de Gastroenterologia**, p. 253-259, 2002.

CHANG, W. J., DU, Y., ZHAO, X., MA, L. Y., & CAO, G. W. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 16, p. 4586-4596, 2014.

CHIURILLO, Miguel Angel. Role of gene polymorphisms in gastric cancer and its precursor lesions: Current knowledge and perspectives in Latin American countries. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 16, p. 4503-4515, 2014.

CHUNG, Hye Won; LIM, Jong-Baeck. Role of the tumor microenvironment in the pathogenesis of gastric carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 7, p. 1667-1680, 2014.

CORREA, Pelayo. Chronic gastritis: a clinico-pathological classification. **American Journal of Gastroenterology**, v. 83, n. 5, 1988.

CRAFT, Joseph E. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 6, p. 337-347, 2012.

CRAWLEY, E., KAY, R., SILLIBOURNE, J., PATEL, P., HUTCHINSON, I., & WOO, P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 6, p. 1101-1108, 1999.

DEMARIA, S., PIKARSKY, E., KARIN, M., COUSSENS, L. M., CHEN, Y. C., EL-OMAR, E. M., ... & KRIEG, A. Cancer and inflammation: promise for biological therapy. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 33, n. 4, p. 335, 2010.

EL-OMAR, E. M., CARRINGTON, M., CHOW, W. H., MCCOLL, K. E., BREM, J. H., YOUNG, H. A., ... & LANYON, G. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 398-402, 2000.

ESKDALE, J., GALLAGHER, G., VERWEIJ, C. L., KEIJSERS, V., WESTENDORP, R. G., & HUIZINGA, T. W. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9465-9470, 1998.

FEHLINGS, M., DROBBE, L., MOOS, V., VIVEROS, P. R., HAGEN, J., BEIGIER-BOMPADRE, M., ... & MEYER, T. F. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. **Infection and immunity**, v. 80, n. 8, p. 2724-2734, 2012.

FIorentino, David F.; BOND, Martha W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081-2095, 1989.

GARCÍA-GONZÁLEZ, María Asunción et al. Prognostic role of host cyclooxygenase and cytokine genotypes in a Caucasian cohort of patients with gastric adenocarcinoma. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e46179, 2012.

GARCIA, P., ALENCAR, D., PINTO, P., SANTOS, N., SALGADO, C., SORTICA, V. A., ... & SANTOS, S. Haplotypes of the IL10 gene as potential protection factors in leprosy patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 10, p. 1599-1603, 2013.

GONDA, Tamas A.; TU, Shuiping; WANG, Timothy C. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. **Cell cycle**, v. 8, n. 13, p. 2005-2013, 2009.

GONZALEZ-HORMAZABAL, P., MUSLEH, M., BUSTAMANTE, M., STAMBUK, J., ESCANDAR, S., VALLADARES, H., ... & RUBIO-REYES, C. Role of cytokine gene polymorphisms in gastric cancer risk in Chile. **Anticancer research**, v. 34, n. 7, p. 3523-3530, 2014.

GUO, X. F., WANG, J., YU, S. J., SONG, J., JI, M. Y., CAO, Z., ... & DONG, W. G. TNF- $\alpha$ -308 polymorphism and risk of digestive system cancers: a meta-analysis. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 48, p. 9461, 2013.

GUTIERREZ-GONZALEZ, A., BELDA-INIESTA, C., BARGIELA-IPARRAGUIRRE, J., DOMINGUEZ, G., ALFONSO, P. G., PERONA, R., & SANCHEZ-PEREZ, I. Targeting Chk2 improves gastric cancer chemotherapy by impairing DNA damage repair. **Apoptosis**, v. 18, n. 3, p. 347-360, 2013.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

\_\_\_\_\_. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARRINGTON, L. E., HATTON, R. D., MANGAN, P. R., TURNER, H., MURPHY, T. L., MURPHY, K. M., & WEAVER, C. T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1123-1132, 2005.

HOU, Chenggong; YANG, Feng. Interleukin-17A gene polymorphism is associated with susceptibility to gastric cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 6, p. 7378, 2015.

HYUN, M. H., LEE, C. H., KANG, M. H., PARK, B. K., & LEE, Y. H. Interleukin-10 promoter gene polymorphisms and susceptibility to asthma: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53758, 2013.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. “**O que é câncer?**”. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 05. Fev 2014.

\_\_\_\_\_. **De Doença desconhecida a problema de saúde pública: O INCA e o controle do câncer no Brasil.** Acesso em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca\\_desconhecida\\_saude\\_publica.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_desconhecida_saude_publica.pdf)>. Acesso em: 06. Fev 2014.

\_\_\_\_\_. **Estimativas 2014.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>> Acesso em: 06. Fev 2014.

KHATAMI, Mahin. Unresolved inflammation and cancer: loss of natural immune surveillance as the correct ‘target’ for therapy! Seeing the ‘Elephant’ in the light of logic. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 62, n. 3, p. 501-509, 2012.

\_\_\_\_\_. Chronic inflammation: synergistic interactions of recruiting macrophages (TAMs) and eosinophils (Eos) with host mast cells (MCs) and tumorigenesis in CALTs. M-CSF, suitable biomarker for cancer diagnosis!. **Cancers**, v. 6, n. 1, p. 297-322, 2014.

KING, A., BALAJI, S., LE, L. D., MARSH, E., CROMBLEHOLME, T. M., & KESWANI, S. G. Interleukin-10 regulates fetal extracellular matrix hyaluronan production. **Journal of pediatric surgery**, v. 48, n. 6, p. 1211-1217, 2013.

KONTUREK, P. C., KONTUREK, S. J., & BRZOZOWSKI, T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 3-21, 2009.

KOSS, K., SATSANGI, J., FANNING, G. C., WELSH, K. I., & JEWELL, D. P. Cytokine (TNF $\alpha$ , LT $\alpha$  and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. **Genes and immunity**, v. 1, n. 3, p. 185-190, 2000.

LAMB, Acacia; CHEN, Lin-Feng. Role of the Helicobacter pylori-Induced inflammatory response in the development of gastric cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 491-497, 2013.

LANSDORP-VOGELAAR, Iris; SHARP, Linda. Cost-effectiveness of screening and treating Helicobacter pylori for gastric cancer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 6, p. 933-947, 2013.

LASTÓRIA, Joel Carlos; ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado de. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects-Part 2. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 3, p. 389-401, 2014.

LEAL, M. F., CHUNG, J., CALCAGNO, D. Q., ASSUMPCAO, P. P., DEMACHKI, S., DA SILVA, I. D. C. G., ... & SMITH, M. D. A. C. Differential proteomic analysis of noncardia gastric cancer from individuals of northern Brazil. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e42255, 2012.

LEE, K. E., KHOI, P. N., XIA, Y., PARK, J. S., JOO, Y. E., KIM, K. K., ... & JUNG, Y. D. Helicobacter pylori and interleukin-8 in gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 45, p. 8192-8202, 2013.

LEE, K. A., GAY, C., PULLINGER, C. R., HENNESSY, M. D., ZAK, R. S., & AOUIZERAT, B. E. Cytokine polymorphisms are associated with poor sleep maintenance in adults living with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. **Sleep**, v. 37, n. 3, p. 453, 2014.

LIMA, T. H. B. D., DAHER, S., SASS, N., MATTAR, R., FRANCHIM, C. S., BARREIRO, E. G., & ROCHA, J. E. S. D. Polimorfismos de genes de citocinas na pré-eclâmpsia. **Femina**, v. 37, n. 4, p. 213-216, 2009.

LISTOWSKA, M., GLAC, W., GREMBECKA, B., GRZYBOWSKA, M., & WRONA, D. Changes in blood CD4+ T and CD8+ T lymphocytes in stressed rats pretreated chronically with desipramine are more pronounced after chronic open field stress challenge. **Journal of neuroimmunology**, v. 282, p. 54-62, 2015.

LIU, Bing; QU, Liyan; YAN, Shigui. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. **Cancer cell international**, v. 15, n. 1, p. 1, 2015.

LIU, Z., LU, F., PAN, H., ZHAO, Y., WANG, S., SUN, S., ... & WANG, L. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication. **Atherosclerosis**, v. 221, n. 1, p. 232-241, 2012.

MACIEL, L. G. L., RODRIGUES, E. M. R., DOS SANTOS, N. P. C., DOS SANTOS, Â. R., GUERREIRO, J. F., & SANTOS, S. Afro-derived Amazonian populations: inferring continental ancestry and population substructure. **Human biology**, v. 83, n. 5, p. 627-636, 2011.

MADEJ-MICHNIEWICZ, A., BUDKOWSKA, M., SAŁATA, D., DOŁĘGOWSKA, B., STARZYŃSKA, T., & BŁOGOWSKI, W. Evaluation of selected interleukins in patients with different gastric neoplasms: a preliminary report. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

MATKOWSKYJ, K.A; CHEN, Z.E; RAO, M.S, YANG, G.Y (2013). Dysplastic lesions in inflammatory bowel disease: molecular pathogenesis to morphology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 137, n. 3, p. 338-350, 2013.

MATSUSAKA, K., FUNATA, S., FUKAYAMA, M., & KANEDA, A. DNA methylation in gastric cancer, related to Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 14, p. 3916-3926, 2014.

MCLEAN, Mairi H.; EL-OMAR, Emad M. Genetics of gastric cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 11, p. 664-674, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SIM. (1999): Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao\\_cancer\\_br2.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao_cancer_br2.pdf)>. Acesso em: 17 Set 2015.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual review of immunology**, v. 7, n. 1, p. 145-173, 1989.

MÜLLER, L. B., FAGUNDES, R. B., MORAES, C. C. D., & RAMPAZZO, A. Prevalência da infecção por helicobacter pylori e das lesões precursoras do câncer gástrico em pacientes dispépticos. **Arquivos de gastroenterologia**. São Paulo. Vol. 44, n. 2 (abr./jun. 2007), p. 93-98, 2007.

NAKAYAMADA, S; TAKAHASHI, H; KANNO, Y; O'SHEA, J.J. Helper T cell diversity and plasticity. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 3, p. 297-302, 2012.

NI, P., XU, H., XUE, H., LIN, B., & LU, Y. A meta-analysis of interleukin-10-1082 promoter polymorphism associated with gastric cancer risk. **DNA and cell biology**, v. 31, n. 4, p. 582-591, 2012.

NIU, Y. Z., GONG, G. Q., CHEN, S., CHEN, J. J., KONG, W. J., & WANG, Y. J. Effects of IL-17 on expression of GRO- $\alpha$  and IL-8 in fibroblasts from nasal polyps. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 34, p. 591-595, 2014.

NORMANTON, Marília; MARTI, Luciana Cavalheiro. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 11, n. 2, p. 237-246, 2013.

OHKURA, Naganari; KITAGAWA, Yohko; SAKAGUCHI, Shimon. Development and maintenance of regulatory T cells. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 414-423, 2013.

ORDITURA, M., GALIZIA, G., SFORZA, V., GAMBARDELLA, V., FABOZZI, A., LATERZA, M. M., ... & LIETO, E. Treatment of gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 7, p. 1635-1649, 2014.

PAN, X. F., YANG, S. J., LOH, M., XIE, Y., WEN, Y. Y., TIAN, Z., ... & YANG, C. X **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 4, p. 2577-2582, 2013.

PARRA, E. J., MARCINI, A., AKEY, J., MARTINSON, J., BATZER, M. A., COOPER, R., ... & SHRIVER, M. D. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 6, p. 1839-1851, 1998.

PARRA, E., MUSTELIN, T., DOHLSTEN, M., & MERCOLA, D. Identification of a CD28 response element in the CD40 ligand promoter. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 4, p. 2437-2443, 2001.

PARK, H., LI, Z., YANG, X. O., CHANG, S. H., NURIEVA, R., WANG, Y. H., ... & DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133-1141, 2005.

PELETEIRO, B., LUNET, N., CARRILHO, C., DURÃES, C., MACHADO, J. C., LA VECCHIA, C., & BARROS, H. Association between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions: systematic review and meta-analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 3, p. 762-776, 2010.

PEREIRA, P. **Inflamação crônica**. 2004. Disponível em: <[http://www.fop.unicamp.br/ddo/patologia/downloads/db301\\_un4\\_InflamCronica.pdf](http://www.fop.unicamp.br/ddo/patologia/downloads/db301_un4_InflamCronica.pdf)>. Acesso em: 13 Fev. 2014.

PELUCCHI, C., LUNET, N., BOCCIA, S., ZHANG, Z. F., PRAUD, D., BOFFETTA, P., ... & JOHNSON, K. C. The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 24, n. 1, p. 16-23, 2015.

PERSSON, C., CANEDO, P., MACHADO, J. C., EL-OMAR, E. M., & FORMAN, D. Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: A HuGE systematic review and meta-analyses. **American journal of epidemiology**, p. kwq370, 2010.

PINTO, P., SALGADO, C., SANTOS, N. P. C., SANTOS, S., & RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. Influence of Genetic Ancestry on INDEL Markers of NFK $\beta$ 1, CASP8, PAR1, IL4 and CYP19A1 Genes in Leprosy Patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, p. e0004050, 2015.

PUTOCZKI, T. L., THIEM, S., LOVING, A., BUSUTTIL, R. A., WILSON, N. J., ZIEGLER, P. K., ... & BOGLEV, Y. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. **Cancer cell**, v. 24, n. 2, p. 257-271, 2013.

PRITCHARD, J.K; DONNELLY, P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. **Theoretical population biology**, v. 60, n. 3, p. 227-237, 2001.

QIN, S. Y., JIANG, H. X., LU, D. H., & ZHOU, Y. Association of interleukin-10 polymorphisms with risk of irritable bowel syndrome: a meta-analysis. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 48, p. 9472-9480, 2013.

QIN, B., WANG, J., LIANG, Y., YANG, Z., & ZHONG, R. The association between TNF- $\alpha$ , IL-10 gene polymorphisms and primary Sjögren's syndrome: a meta-analysis and systemic review. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63401, 2013.

QUAN, Y., ZHOU, B., WANG, Y., DUAN, R., WANG, K., GAO, Q., ... & XI, M. Association between IL17 polymorphisms and risk of cervical cancer in Chinese women. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

RAFIEI, A., HOSSEINI, V., JANBABAI, G., GHORBANI, A., AJAMI, A., FARZMANDFAR, T., ... & MERRELL, D. S. Polymorphism in the interleukin-17A

promoter contributes to gastric cancer. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 34, p. 5693-5699, 2013.

RESENDE, Ana Lucia da Silva; MATTOS, Inês Echenique; KOIFMAN, Sergio. Mortalidade por câncer gástrico no estado do Pará, 1980-1997. **Arq. gastroenterol**, v. 43, n. 3, p. 247-252, 2006.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. C., CARVALHO, B. M., FEIO-DOS-SANTOS, A. C., & DOS SANTOS, S. E. B. Nucleotide variability of HV-I in Afro-descendents populations of the Brazilian Amazon Region. **Forensic science international**, v. 167, n. 1, p. 77-80, 2007.

ROGERIO, A. D. P., OLIVEIRA, C. J. F., DE ANDRADE, E. L., & CARLO, T. Modulation of Lung Immune Response 2014. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

ROKKAS, T., SECHOPOULOS, P., PISTIOLAS, D., KOTHONAS, F., MARGANTINIS, G., & KOUKOULIS, G. Population differences concerning TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in gastric carcinogenesis based on meta-analysis. **Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology**, v. 27, n. 2, p. 139, 2014.

ROTAR, I. C., MUREȘAN, D., RADU, P., PETRIȘOR, F., APOSTOL, S., MARIANA, T., ... & STAMATIEN, F. TNF- $\alpha$  308 G/A polymorphism and cervical intraepithelial neoplasia. **Anticancer research**, v. 34, n. 1, p. 373-378, 2014.

RUNDHAUG, J. E., SIMPER, M. S., SURH, I., & FISCHER, S. M. The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, n. 3-4, p. 465-480, 2011.

SALIM, Patricia Hartstein; XAVIER, Ricardo Machado. Influence of genetic polymorphisms (IL-10/CXCL8/CXCR2/NF $\kappa$ B) on the susceptibility of autoimmune rheumatic diseases. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 54, n. 4, p. 301-310, 2014.

SANTOS, N. P., RIBEIRO-RODRIGUES, E. M., RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K., PEREIRA, R., GUSMÃO, L., AMORIM, A., ... & SANTOS, S. E. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human mutation**, v. 31, n. 2, p. 184-190, 2010.

SANTOS, J. C., LADEIRA, M. S. P., PEDRAZZOLI JR, J., & RIBEIRO, M. L. Relationship of IL-1 and TNF- $\alpha$  polymorphisms with *Helicobacter pylori* in gastric diseases in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 9, p. 811-817, 2012.

SAKTHIVEL, Kunnathur Murugesan; GURUVAYOORAPPAN, Chandrasekaran. *Acacia ferruginea* inhibits tumor progression by regulating inflammatory mediators- (TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2, GM-CSF) and pro-angiogenic growth factor-VEGF. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 6, p. 3909-3919, 2013.

SHEN, L., SHAN, Y. S., HU, H. M., PRICE, T. J., SIROHI, B., YEH, K. H., ... & PARK, S. R. Management of gastric cancer in Asia: resource-stratified guidelines. **The lancet oncology**, v. 14, n. 12, p. e535-e547, 2013.

SHIBATA, T., TAHARA, T., HIRATA, I., & ARISAWA, T. Genetic polymorphism of interleukin-17A and-17F genes in gastric carcinogenesis. **Human immunology**, v. 70, n. 7, p. 547-551, 2009.

SHRIVER, Mark D. Ethnic variation as a key to the biology of human disease. **Annals of internal medicine**, v. 127, n. 5, p. 401-403, 1997.

SINUANI, I., BEBERASHVILI, I., AVERBUKH, Z., & SANDBANK, J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. **World J Transplant**, v. 3, n. 4, p. 91-98, 2013.

SODSAI, P., SURAKIATCHANUKUL, T., KUPATAWINTU, P., TANGKITVANICH, P., & HIRANKARN, N. Association of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms with the risk of chronic hepatitis B. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 31, n. 4, p. 277, 2013.

SOUZA, A. W. S. D., MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., CRUVINEL, W. D. M., ANDRADE, L. E. C., & SILVA, N. P. D. Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

SWANN, Jeremy B.; SMYTH, Mark J. Immune surveillance of tumors. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, 2007.

SUGIMOTO, M; YAMAOKA, Y; FURUTA, T. (2010). Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 10, p. 1188-1200, 2010.

TABORDA, Aline Gamarra. **Fatores alimentares envolvidos no desenvolvimento de metaplasia intestinal em dispépticos funcionais**. 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/52954>>. Acesso em: 23 Fev. 2014.

TAHARA, T., SHIBATA, T., NAKAMURA, M., YAMASHITA, H., YOSHIOKA, D., OKUBO, M., ... & KAMIYA, Y. Effect of polymorphisms of IL-17A,-17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. **International journal of molecular medicine**, v. 24, n. 4, p. 563, 2009.

TIMMANN, C., FUCHS, S., THOMA, C., LEPPING, B., BRATTIG, N. W., SIEVERTSEN, J., ... & HORSTMANN, R. D. Promoter haplotypes of the interleukin-10 gene influence proliferation of peripheral blood cells in response to helminth antigen. **Genes and immunity**, v. 5, n. 4, p. 256-260, 2004.

TOLIDE-IE, Hamidreza; TABATABAEE, Hamid Reza; KAMALI-SARVESTANI, Eskandar. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$ -308 G/A polymorphism and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. **Iranian journal of medical sciences**, v. 39, n. 1, p. 2, 2014.

TSAI, H. C., VELICHKO, S., HUNG, L. Y., & WU, R. IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.

VALENZUELA, M. A., CANALES, J., CORVALÁN, A. H., & QUEST, A. F. Helicobacter pylori-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 45, p. 12742, 2015.

VIDAL, Amanda Ferreira; CRUZ, Aline MP; MAGALHÃES, Leandro; PEREIRA, Adenilson L; ANAISSI, Ana KM; ALVES, Nélisson CF; ALBUQUERQUE, Paulo JBS; BURBANO, Rommel MR; DEMACHKI, Samia & RIBEIRO-DOS-SANTOS, Ândrea. *Has-miR-29c* and *has-miR-135b* differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. **World J Gastroenterol**. v. 22, n 6, p. 2060–2070, 2016.

VIEIRA, P. C. M., BURBANO, R. M. R., FERNANDES, D. C. R. O., Montenegro, R. C., DOS SANTOS, S. E. B., Sortica, V. A., ... & DOS SANTOS, N. P. C. Population stratification effect on cancer susceptibility in an admixed population from Brazilian Amazon. **Anticancer research**, v. 35, n. 4, p. 2009-2014, 2015.

VILAR E SILVA, A., JUNIOR, M. R. D. S., VINAGRE, R. M. D. F., SANTOS, K. N., DA COSTA, R. A. A., FECURY, A. A., ... & MARTINS, L. C. Evaluation of the pattern of EPIYA motifs in the Helicobacter pylori *cagA* gene of patients with gastritis and gastric adenocarcinoma from the Brazilian Amazon Region. **International journal of bacteriology**, v. 2014, 2014.

VINAGRE, Ruth Maria Dias Ferreira; CAMPOS, Brenda Prazeres de; SOUSA, Rachid Marwan Pinheiro. Case study of stomach adenocarcinoma conducted at a cancer referral hospital in northern Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 49, n. 2, p. 125-129, 2012.

VINAGRE, R. M. D. F., VILAR-e-SILVA, A., FECURY, A. A., & MARTINS, L. C. Role of Helicobacter pylori infection and lifestyle habits in the development of gastroduodenal diseases in a population from the brazilian Amazon. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 50, n. 3, p. 170-174, 2013.

WANG, Dingzhi; DUBOIS, Raymond N. Prostaglandins and cancer. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 115-122, 2006.

\_\_\_\_\_. Inflammatory mediators and nuclear receptor signaling in colorectal cancer. **Cell Cycle**, v. 6, n. 6, p. 682-685, 2007.

WANG. J.B; LI, H; WANG, L.L; LIANG, H.D; ZHAO, L; DONG, J. Role of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and IFN- $\gamma$  in pathogenesis of central nervous system neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 16658, 2015.

WANG, L., JIA, D., DUAN, F., SUN, Z., LIU, X., ZHOU, L., ... & GU, J. Combined anti-tumor effects of IFN- $\alpha$  and sorafenib on hepatocellular carcinoma in vitro and in

vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 422, n. 4, p. 687-692, 2012.

WANG, X., LIN, Y., LAN, F., YU, Y., OUYANG, X., LIU, W., ... & HUANG, Q. BAX and CDKN1A polymorphisms correlated with clinical outcomes of gastric cancer patients treated with postoperative chemotherapy. **Medical Oncology**, v. 31, n. 11, p. 1-10, 2014.

WEINBERG, Robert A. **A biologia do câncer**. ArtMed, Porto Alegre, 2008.

WU, X., ZENG, Z., CHEN, B., YU, J., XUE, L., HAO, Y., ... & HU, P. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 1, p. 86-92, 2010.

XUE, H., LIN, B., AN, J., ZHU, Y., & HUANG, G. Interleukin-10-819 promoter polymorphism in association with gastric cancer risk. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

YAN, Huichao; TONG, Zan. Interleukin-17F: A promising candidate of cancer therapy. **Immunogastroenterology**, v. 1, p. 100, 2012.

YANG, J. P., HYUN, M. H., YOON, J. M., PARK, M. J., KIM, D., & PARK, S. Association between TNF- $\alpha$ -308 G/A gene polymorphism and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 104-114, 2014.

YU, Z., LIU, Q., HUANG, C., WU, M., & LI, G. The interleukin 10- 819C/T polymorphism and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis of 73 studies including 15,942 cases and 22,336 controls. **Omic: a journal of integrative biology**, v. 17, n. 4, p. 200-214, 2013.

ZABALETA, J., VELASCO-GONZALEZ, C., ESTRADA, J., RAVUSSIN, E., PELLIGRINO, N., MOHLER, M. C., ... & HAPPEL, K. Inverse correlation of serum inflammatory markers with metabolic parameters in healthy, Black and White prepubertal youth. **International journal of obesity**, v. 38, n. 4, p. 563-568, 2014.

ZENG, J. R., XU, X. L., YU, X. J., HOU, J., XU, T. J., MI, M., ... & ZANG, W. J. [Dynamic correlation of TNF- $\alpha$  and IL-10 with myocardial remodeling induced by pressure overload in rats]. **Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi= Chinese journal of cellular and molecular immunology**, v. 28, n. 7, p. 699-701, 708, 2012.

ZHANG, Q., CHEN, B., YAN, F., GUO, J., ZHU, X., MA, S., & YANG, W. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

ZHANG Y.M; ZHOU X.C; XU, Z; TANG. C.J. Meta-analysis of epidemiological studies of association of two polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter and colorectal cancer risk. **Genet Mol Res**, v. 11, n. 3, p. 3389-97, 2012.

## APÊNDICES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
HOSPITAL JOÃO DE BARROS BARRETO



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

**PROJETO:** INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE CITOCINAS NO CÂNCER GÁSTRICO

A Universidade Federal do Pará (UFPA) juntamente com o Programa de Pós Graduação em Oncologia e Ciências médicas (PPGOCM) estão desenvolvendo uma pesquisa que avaliará o sangue de pacientes da UNACON localizada no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), com o objetivo de permitir o melhor entendimento e prevenção do câncer gástrico. Após a sua autorização, suas doações serão encaminhadas a exames laboratoriais. Estas coletas não implicarão em riscos à sua saúde ou mudança no seu tratamento. Não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os resultados decorrentes da pesquisa. Se necessário, o restante do material não utilizado será armazenado para novos exames. A sua identidade será preservada durante a publicação dos dados obtidos na pesquisa.

Caso você tenha alguma dúvida, entre em contato com a pesquisadora Gabriela Almeida de Oliveira- telefone (91) 82678724 ou Ândrea Kely Ribeiro dos Santos (91) 8143-1169. Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e uma cópia lhe será fornecida.

---

**Assinatura do Pesquisador Responsável**

Nome: Gabriela Almeida de Oliveira  
RG: 4579541 CPF: 894.619.752-87  
E-mail: gabriela\_gm4@hotmail.com/gabrielaoliveira2@gmail.com

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto esclarecido sobre o seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

---

Assinatura do Voluntário

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_: \_\_\_\_

Responsável por aplicar o TCLE: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_: \_\_\_\_

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE CITOCINAS NO CÂNCER GÁSTRICO

**Pesquisador:** GABRIELA ALMEIDA DE OLIVEIRA

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 30382514.0.0000.0018

**Instituição Proponente:** Núcleo de Pesquisa em Oncologia

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO AMAZONIA PARAENSE DE AMPARO A PESQUISA - FAPESPA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 653.354

**Data da Relatoria:** 27/05/2014

**Apresentação do Projeto:**

O presente estudo pretende analisar e investigar os polimorfismos dos genes das interleucina IL17 (\*197A), IL 17F (\*A7488G), TNF $\zeta$  (\*308A), IL-10(\*G-1082A), IL10(\*C-819T) e IL10(\*C-592A) na patogênia do câncer gástrico, na cidade de Belém (Pa), identificando por meio da PCR em Tempo Real os polimorfismos presentes nos genes das interleucinas em questão, em amostras de pacientes com câncer gástrico. Comparar os padrões de expressão dos polimorfismos presentes nos genes das citocinas em questão, em amostras de sangue de 100 pacientes com lesões precursoras ao câncer gástrico intestinal (gastrite superficial não-atrôfica, gastrite superficial atrôfica, metaplasia intestinal e displasia), adenocarcinomas gástricos e em amostras de sangue de 100 pacientes sem lesões.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Investigar se os polimorfismos dos genes das interleucina IL17 (\*197A), IL 17F (\*A7488G), TNF $\zeta$  (\*308A), IL-10(\*G-1082A), IL10(\*C-819T) e IL10(\*C-592A) auxiliam na patogênia do câncer gástrico, na cidade de Belém (Pa).

Objetivo Secundário:

**Endereço:** Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

**Bairro:** Campus Universitário do Guamá

**CEP:** 66.075-110

**UF:** PA

**Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3201-7735

**Fax:** (91)3201-8028

**E-mail:** cepccs@ufpa.br

Continuação do Parecer: 653.354

-Identificar por meio da PCR em Tempo Real, os polimorfismos presentes nos genes das interleucinas IL17 (\*197A), IL 17F (\*A7488G), TNF (\*308A), IL-10(\*G-1082A), IL10(\* C-819T) e IL 10(\*C-592A), em amostras de pacientes com câncer gástrico;- Identificar e comparar os padrões de expressão dos polimorfismos presentes nos genes das citocinas em questão, em amostras de sangue de pacientes com lesões precursoras ao câncer gástrico intestinal (gastrite superficial não-atrôfica, gastrite superficial atrôfica, metaplasia intestinal e displasia), adenocarcinomas gástricos e em amostras de sangue de pacientes sem lesões.- Comparar o perfil de expressão desses polimorfismos das amostras deste estudo com os dados de PCR em Tempo Real já descritos na literatura;- Desenvolver uma metodologia simples de investigação que permita a prevenção do câncer gástrico, baseada em uma possível validação dos polimorfismos de genes de citocinas que possam ser utilizados como potenciais biomarcadores.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

A pesquisa não apresenta riscos, aparentes, aos pacientes nem aos pesquisadores.

Benefícios:

Entre os benefícios da pesquisa estão o maior esclarecimento da relação entre a inflamação e o processo de tumorigênese ainda bastante obscuro;os dados bibliográficos em relação a este assunto ainda são escassos, sendo primordial a iniciativa para novas pesquisas a fim de esclarecimento e detecção prematura da doença, através do desenvolvimento de possíveis biomarcadores, assim como também a determinação risco a que o indivíduo está exposto.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O protocolo apresentado, nesta 2ª versão, dispõe de metodologia e critérios definidos. Sendo contemplados o sugerido no último parecer.

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

Os termos apresentados estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS/MS.

#### **Recomendações:**

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto somos pela aprovação do projeto. Este é nosso parecer, SMJ.

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

**Bairro:** Campus Universitário do Guamá

**CEP:** 66.075-110

**UF:** PA

**Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3201-7735

**Fax:** (91)3201-8028

**E-mail:** cepccs@ufpa.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 653.354

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

BELEM, 20 de Maio de 2014

---

**Assinado por:**  
**Wallace Raimundo Araujo dos Santos**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

**Bairro:** Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110

**UF:** PA **Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br