Tatiane Katsue Furuya

**Associação entre polimorfismos em genes relacionados
à resposta inflamatória e a suscetibilidade, progressão
e prognóstico do câncer gástrico**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Programa de: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2016

Tatiane Katsue Furuya

**Associação entre polimorfismos em genes relacionados
à resposta inflamatória e a suscetibilidade, progressão
e prognóstico do câncer gástrico**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Programa de: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Furuya, Tatiane Katsue

Associação entre polimorfismos em genes relacionados à resposta inflamatória e a suscetibilidade, progressão e prognóstico do câncer gástrico / Tatiane Katsue Furuya.
-- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Neoplasias gástricas 2.Inflamação 3.Polimorfismo genético
4.Estudos de associação genética 5.Predisposição genética para doença 6.Progressão da
doença 7.Análise de sobrevida 8.Prognóstico

USP/FM/DBD-489/16

Dedico essa tese a dois anjinhos na Terra...

Meus pais, Carmem e Jairo!!

E a duas anjinhas no Céu...

Minhas avós, Francisca e Sadaco (in memoriam)!!

AGRADECIMENTOS

A Seção de Agradecimentos com certeza é a parte mais importante da tese para mim, na qual eu gostaria de dedicar um longo tempo e muitas linhas!! Afinal de contas não se conquista um título de Doutora em Ciências sem a colaboração e a participação de inúmeras pessoas, no contexto profissional e talvez mais importante, na vida pessoal! Todos nós crescemos juntos uns com os outros ao longo dessa trajetória.

Já aviso que será uma Seção bem extensa, mas não poderia perder a oportunidade de agradecer imensamente a todos que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse chegar até aqui e para que esse trabalho fosse concluído!! As pessoas não estão listadas em ordem de importância!! Todas tiveram papel mais do que essencial nessa conquista!!

Primeiramente agradeço a Deus! Acredito que a Ciência e a Fé caminham juntas e que uma não existe sem a outra!!

Ao prof Dr Roger Chammas... um exemplo nato de pesquisador e docente, um ser humano fantástico, fonte de inspiração, por quem tenho uma enorme admiração e eterna gratidão!!!! Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo profissionalismo, por me ensinar a ser mais crítica, mais ética, por confiar no meu trabalho e na minha competência, por me incentivar, me motivar, por me abrir as portas, por me fazer enxergar sempre além, por me permitir fazer tudo isso com muito amor!! Obrigada por todas as grandes oportunidades que me ofereceu e por não me deixar desanimar mesmo nos momentos mais difíceis da vida pessoal e profissional!!

Aos meus pais (Carmem e Jairo) e à minha irmã caçula (Thaísa), pois sem vocês a vida não faria o menor sentido!! Com certeza não existe amor maior no mundo do que esse que nos une!! Dedico a vocês todas as conquistas da minha vida!! Obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo, pelo apoio, pela compreensão, pela união nos momentos de alegrias e dificuldades, pelos consolos, pela torcida, por acreditarem em mim, por não me deixarem baixar a cabeça diante dos obstáculos da vida e por fazerem tudo isso simplesmente valer a pena!! Vocês são os únicos que nunca desistiram de mim e é **POR** vocês e **COM** vocês que eu vivo todas as batalhas!! Amo muito vocês!!

Aos médicos cirurgiões (Dr Ulysses, Marcus Kodama e Carlos Jacob) que me auxiliaram em toda a parte clínica desse trabalho. Obrigada pela paciência e por me ensinarem tanto sobre câncer gástrico!! A todos os pesquisadores que colaboraram (direta e indiretamente) e a todas as equipes multidisciplinares envolvidas na execução desse trabalho!! Só quem esteve envolvido sabe o que se passa por trás dos bastidores!! Às agências financiadoras que nos proporcionaram a oportunidade de alcançar esses resultados e, agora, divulgá-los à comunidade científica!! A todos os pacientes que participaram do estudo e seus familiares... vocês são a fonte motivadora por trás de nossas pesquisas!! Obrigada Rossana pelos “*insights*” estatísticos que me ajudaram a conduzir e finalizar algumas das análises!!

Um agradecimento especial à Michele, com quem busco diariamente não só a evolução científica, mas também a espiritual!! Sua colaboração foi essencial para a conclusão desse trabalho! E hoje sei que a nossa afinidade vai além do que o tema desse projeto!!

À banca examinadora e suplente, pelo empenho, pelo tempo que dispuseram em ler e a me ajudar na lapidação desse trabalho!! Agradeço imensamente desde já!!

A todos os integrantes atuais e antigos do Laboratório de Oncologia Experimental (antigo GACC ou Laboratório de Bio Cel), pois somos um grupo que em seus mais diferentes níveis de conhecimento, tem um mesmo propósito em comum, fazer Ciência com comprometimento e qualidade! Aprendo muito na convivência diária com vocês! Obrigada pelas discussões construtivas, pelo companheirismo do dia a dia, pelo empenho de cada um de vocês em fazer tudo isso valer a pena!! Roger, Re, Lu A, And, Silvina, Tharci, Ana Carol, Liz, Pri, Karina, Mari, Silvinha, Jânio, Alexandre, Mauro, Cris, May, Adalts, Felipe, Kma, Lu K, Ramos, Lea, Ana Roberta, Jú Real, Juliana (pré-IC), Klimuk, Angélica, Giovani, Renata (Sul), Rê Cavalcanti, Matheus, Lu Pescatore, Rafa, MM, Carol Rosal... e a todos os outros que passaram e deixaram suas marquinhas por aqui!!

Agradeço especialmente à staff (Re, Lu A, And, Sil e Th) por estarem ao meu lado e não me deixarem baixar a cabeça durante essa jornada!! Por me mostrarem que juntos podemos chegar longe e que o sucesso de um grupo de pesquisa depende basicamente de muito diálogo e de um trabalho em equipe!! Vocês são exemplos para mim, fazem parte da minha vida profissional e, mais importante do que isso, são meus companheiros de vida!!

À Karina, amiga de uma vida!! Sempre digo que você foi essencial na escolha da profissão que decidi seguir!! O destino fez questão de nos unir novamente e tenho certeza de que não foi por mera coincidência... não tenho palavras para agradecer por tudo! SEMPRE!

À Liz... que veio de tão longe para me mostrar que não existem barreiras culturais quando duas pessoas tem afinidade! Tenho certeza de que aprendemos muito uma com a outra! Obrigada por compartilhar tantas alegrias comigo e por segurar minha mão todas as vezes que precisei!!

À Pri, você é "única" nesse planeta! Amiga cientista, hiperativa, que está sempre a todo vapor!! Juntas compartilhamos muito mais do que discussões sobre genética!! Obrigada pela amizade, risadas, apoio e por ser tão "sem filtro", o que torna tudo muito mais divertido!! Se depender da Pri, o Pedrinho também será cientista!!

À querida Rose, a primeira a me receber no laboratório, quando cheguei perdida em 2010!! A afinidade que nos une não está escrita em nenhum lugar!! Obrigada por não me deixar chegar nem perto de pensar em desistir dos meus sonhos!! Juntas compartilhamos muito mais do que a vivência de laboratório, pipetagens, longas

jornadas de experimentos com *microarray*!! Juntas construímos uma história de muitas batalhas e, felizmente, muitas alegrias!!

Ao grupo das “sete meninas”, que me acolheram de braços abertos quando cheguei ao LIM24: Rose, Lúcia, Fátima, Flávia, Simone e Pati!!! Obrigada pelos aprendizados, pelas risadas, conselhos, descontrações, conversas, cafés e por tornarem tudo isso mais divertido!! Obrigada pelos ensinamentos e por me deixarem fazer parte da história de vocês!!

À Faby e Gi, que apareceram de mansinho durante a minha caminhada na FMUSP/ICESP e hoje ocupam um espacinho todo especial na minha vida, mesmo distantes... eu não imaginava que a gente iria se dar tão bem!! Vocês são duas queridas!! Juntas compartilhamos inúmeras angústias e incertezas, mas também muitas alegrias e conquistas, incluindo a chegada do Lorenzo e do Lucas!!

À Denise, Val e Mi, que me trouxeram muitas energias positivas para recarregar as baterias ao longo desse ano!

Um carinho especial às meninas Re, Lu A, And, Sil e Ana Carol... companheiras de lab, de discussões científicas, de marmitas diárias e de muitos desabafos! Com vocês ao meu lado esse percurso tornou-se menos pedregoso, mais divertido e os sonhos muito mais palpáveis. Obrigada pela paciência, compreensão, apoio, palavras e tudo o que vocês representam! Felipinho e pequeno Gú também fazem parte das nossas histórias de vida!!

À equipe administrativa e técnica do CTO, que nos dão todo suporte necessário e fazem tudo isso acontecer de maneira eficiente!! Um agradecimento especial à Taynah, Lara, Cris, Wesley, Luis, Renan, Faiola e ao pessoal da Engenharia Clínica, pois sem o trabalho e dedicação de vocês, o CTO não estaria como está hoje!!

A todos os demais grupos do CTO e anexos (Onco Experimental, Genética Molecular, Biologia Molecular, Vetores Virais, Biobanco, Oncogenômica, Cabeça e Pescoço, M2C, Patologia, Gastro, Centro de Medicina Nuclear, Inovação em Câncer, Pesquisa Clínica, Epidemio). A todos os alunos, pesquisadores, docentes, colaboradores, médicos, orientadores!!

Às meninas “Single Cell”... Laura, Miyuki e Lara!! Tem sido ótimo trabalhar com vocês!! Muitas responsabilidades virão pela frente!! Mas a gente torna tudo mais divertido!!

Ema, Suellen, Aline e Nai!! Passamos bons momentos juntas na UdeM em Montreal!! Os ensinamentos foram muito além das aulas teórico-práticas que tivemos... vocês participaram de uma transição de fase da minha vida!! Ema querida, que saudades!!

Obrigada prof Roger e profa Luisa Villa, pela excelente coordenação do nosso Programa de Pós-graduação e por terem confiado a mim a responsabilidade de atuar como representante discente. Um obrigado especial à Débora, nossa tão empenhada e

dedicada secretária, pois tivemos oportunidade de conviver bastante nesse último ano. À Dona Yara, que também nos ajudou muito antes da chegada da Débora! A todos os alunos e orientadores que compõem o programa!! Um agradecimento especial aos alunos que participaram comigo da organização das VII e VIII Jornadas da Pós-Graduação em Oncologia (Ema, Marlous, Igor, Adalts, Liz e May em 2015 e Emily, Lourival, Liz, Camila e Misaki em 2016). Juntos nós superamos as expectativas!! Foi realmente um exercício de liderança!!

À Vanessa Baptista, grande amiga e incentivadora!! Você me fez acreditar em mim... você me mostrou meu potencial e não me deixou desistir dos meus sonhos nem por um segundo sequer... devo tudo isso a você Van!! Obrigada do fundo do meu coração!!

A todos os meus tios, primos (famílias Takeshita e Furuya) e padrinhos (tia Teiko e tio Mário)!! Vocês são MUITOS para eu listar aqui, mas sintam-se abraçados neste momento!! Afinal de contas a família é e sempre foi a base de tudo para mim!! Vocês acompanharam e continuarão acompanhando de pertinho toda a minha história, todas as lutas, todas as vitórias!! Vocês me deram muitos exemplos, me proporcionaram muitos ensinamentos e me ensinaram que não existem limites quando queremos muito alcançar algum objetivo!!

Às minhas queridas batchans Francisca e Sadaco (*in memoriam*), que deixaram muitas saudades! E aos meus ditchans Hideo (*in memoriam*) e Eduardo!!

Às minhas amigas “etapadas”... amigas de colégio, de batalhas, de muitas conquistas, irmãs de mais da metade de uma vida... Carol, Karina e Karen!! Nós crescemos juntas e nem imaginávamos onde iríamos chegar quando tudo isso começou!!! Vocês são parte fundamental de todas as conquistas pessoais e profissionais!! Um carinho todo especial também ao Gordo (Paraventi)!! Vocês moram no meu coração!! Vocês participaram da escolha “do que eu vou ser quando crescer”!!

Às minhas cinco irmãs de graduação (Van, Mari, Ro, Jú e Pri)!! E a mais nova integrante desse grupo, pequena Mel!! São 12 anos de uma amizade inabalável, não importa a distância e o tempo!! Vocês sempre estiveram presentes e juntas nós formamos uma família!! Vocês acompanharam tudo de pertinho!! Me orgulho demais por tê-las como parte da minha vida!! Me orgulho muito de ver onde vocês conseguiram chegar!! O apoio de vocês é fundamental!!

À família Mazzotti (Diego, Vavá, Dri e vô Osvaldo), pelos 10 anos maravilhosos de convivência, aprendizados e por todo o carinho. Embora nossos caminhos tenham tomado rumos diferentes, vocês acompanharam de perto grande parte do meu crescimento pessoal e profissional... vocês fizeram parte dessa conquista!! Serei eternamente grata!!

A todos os meus queridos amigos da Disciplina de Genética da UNIFESP, em especial à velha guarda: Van, Pat, Mari, Si, Fewis, Leo, Deni, Fe B, Marquinhos, Marizinha, Leslie, Ianna e mais recentemente Ane, Letícia e Dri. Com vocês a vida foi

(e ainda é) muito mais divertida!! Agradeço demais por ainda fazer parte disso tudo!! Às professoras Bel, Gianna, Janete e Marília, que me ensinaram muito mais do que genética!! Um agradecimento especial à minha orientadora de Iniciação Científica e Mestrado, profa Dra Marília Smith Cardoso, com quem iniciei minha carreira científica estudando genética do envelhecimento e posteriormente genética de doenças neurodegenerativas. Obrigada pelos ensinamentos, pela formação e por cultivar minha paixão por genética!!

Aos meus colegas e professores da graduação, que participaram da minha formação profissional e da descoberta da paixão pela pesquisa...

Pat, Mari e Van... vocês são amigas mais do que especiais e moram no meu coração!! Me espelho muito em vocês!! Pesquisadoras fantásticas!! Mentres brilhantes!! Obrigada por estarem comigo sempre!!

Ao pessoal do Luz e Harmonia e do Verde Dentro... não preciso mencionar o significado e o impacto de vocês na minha vida!! Hoje sou uma pessoa muito melhor e vocês tiveram (e continuam tendo) muita participação nessa transformação!!

A todos os pesquisadores e colaboradores com os quais já tive oportunidade de trabalhar ao longo da vida acadêmica, pois cresci muito como pessoa e como profissional. Cada um teve um papel importante e me proporcionou inúmeros aprendizados!! É sempre uma via de mão dupla, pois temos muito o que aprender uns com os outros...

Ao ICESP e a todas as equipes que trabalham nesse hospital!! Tenho orgulho de poder fazer parte disso tudo!!

Gostaria de dedicar algumas linhas à família Paiva Teixeira por todo carinho e pelo acolhimento que me receberam desde o primeiro momento. Palavra nenhuma no mundo vai expressar tamanha gratidão por todo o apoio que tenho recebido!! Obrigada por me deixarem fazer parte dessa família!! Um agradecimento muito especial ao João, por todo amor, carinho, paciência, compreensão, companheirismo, por todos os bons momentos e alegrias que compartilhamos!! Esteja certo de que foi muito mais fácil com você ao meu lado me apoiando!! Obrigada por me incentivar tanto e por não me deixar desistir!!

Por fim e não menos importante, um agradecimento especial ao meu maior companheiro!! Que me traz inúmeras alegrias diárias!! O único que parece me compreender na íntegra... me dá carinho, atenção e colo como ninguém... e não pede absolutamente nada em troca... o Fox!!

A todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho e da minha formação pessoal e profissional. Realmente me surpreendi com a quantidade de pessoas que participam da minha vida!! Os meus mais sinceros agradecimentos!! Todos vocês são “estatisticamente significantes” na minha formação!!

E que venham novos desafios...

“The only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work, and the only way to do great work is to love what you do. If you haven't found it yet, keep looking, and don't settle. As with all matters of the heart, you'll know when you find it. And like any great relationship, it just gets better and better as the years roll on. So keep looking, don't settle.”

Steve Jobs

“Não se faz ciência sozinho”

Roger Chammass

NORMATIZAÇÃO UTILIZADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Epidemiologia do câncer gástrico	2
1.2 Classificações clinicopatológicas do câncer gástrico	3
1.3 Fatores de risco etiológicos para o câncer gástrico	8
1.4 Inflamação e câncer gástrico.....	9
1.5 Fatores de risco genéticos para o câncer gástrico.....	11
1.5.1 <i>COX-2/PTGS2 (Cyclooxygenase-2/prostaglandin-endoperoxide synthase 2)</i>	16
1.5.2 <i>OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1)</i>	18
1.5.3 <i>TNF (Tumor necrosis factor): TNFA e TNFB</i>	19
1.5.4 <i>HSP70 (Heat shock 70kDa protein): HSPA1B e HSPA1L</i>	20
1.5.5 <i>VEGFA (Vascular endothelial growth factor A)</i>	21
1.5.6 <i>IL17F (Interleukin 17F)</i>	24
1.5.7 <i>LGALS3 (Lectin, galactoside-binding, soluble, 3)</i>	25
1.5.8 <i>PHB (Prohibitin)</i>	27
1.5.9 <i>TP53 (Tumor protein p53)</i>	28
1.5.10 Haplótipos	30
JUSTIFICATIVA	32
2. OBJETIVOS	35
3. MÉTODOS.....	38
3.1 Casuística geral (controles e casos com câncer gástrico)	38
3.2 Aspectos Éticos	40
3.3 Características anatomopatológicas (casos com câncer gástrico)	40
3.4 Sobrevida global e livre de doença (casos com câncer gástrico)	42
3.5 Coleta do sangue periférico e obtenção do DNA genômico.....	43
3.6 Polimorfismos selecionados para o estudo	43

3.7 Genotipagem dos polimorfismos selecionados	47
3.7.1 POLIMERASE CHAIN REACTION - RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (PCR-RFLP)	47
3.7.2 PCR em Tempo Real – Ensaio TaqMan®	52
3.8 Análise Estatística	55
3.8.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	55
3.8.2 Modelos Genéticos avaliados	55
3.8.3 Associações dos polimorfismos com o câncer gástrico e/ou com as variáveis anatomopatológicas	56
3.8.4 Associações dos haplótipos com o câncer gástrico e com as variáveis anatomopatológicas	57
3.8.5 Análise de sobrevida global e livre de doença	58
3.8.6 Verificação do tamanho amostral e/ou poder estatístico	59
3.8.7 Outras considerações estatísticas	59
4. RESULTADOS	61
4.1 SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER GÁSTRICO (Estudo Caso-Controle)	63
4.1.1 Descrição da amostra de casos e controles	63
4.1.2 Associação entre os polimorfismos individuais e o câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178)	65
4.1.3 Associação entre os polimorfismos individuais e o câncer gástrico, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)	71
4.1.4 Associação entre os haplótipos e o câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178) ...	73
4.1.5 RESULTADOS PARA OS MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER GÁSTRICO	75
4.2 PROGRESSÃO DO CÂNCER GÁSTRICO (Características Anatomopatológicas)	77
4.2.1 Descrição das características anatomopatológicas do câncer gástrico	77
4.2.2 Associação entre os polimorfismos individuais e as características anatomopatológicas do câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178)	81
4.2.3 Associação entre os polimorfismos individuais e as características anatomopatológicas do câncer gástrico, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)	91
4.2.4 Associação entre os haplótipos e as características anatomopatológicas do câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178)	98
4.2.5 RESULTADOS PARA OS MARCADORES DE PROGRESSÃO DO CÂNCER GÁSTRICO	101
4.3 PROGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO (Sobrevida Global e Livre de Doença)	104

4.3.1 Descrição da Sobrevida Global e Livre de Doença, na amostra total de casos (N=178) .	104
4.3.2 Associação entre os polimorfismos individuais e a Sobrevida Global e Livre de Doença, na amostra total de casos (N=178)	110
4.3.3 Descrição da Sobrevida Global e Livre de Doença, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)	113
4.3.4 Associação entre os polimorfismos individuais e a Sobrevida Global e Livre de Doença do câncer gástrico, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)	118
4.3.5 RESULTADOS PARA OS MARCADORES DE PROGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO	120
4.4 Verificação da adequação do tamanho amostral e/ou poder estatístico	122
4.5 Análises funcionais <i>in silico</i>	125
4.5.1 Predição do efeito funcional dos polimorfismos estudados	125
4.5.2 Construção de uma rede biológica incluindo os genes do estudo	126
5. DISCUSSÃO	129
5.1 O papel da inflamação no câncer gástrico e a hipótese do estudo.....	129
5.2 O desenho experimental e a condução do estudo	131
5.3 Características descritivas da amostra estudada	134
5.4 Verificação do tamanho amostral e/ou poder estatístico	137
5.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	139
5.6 Considerações importantes e limitações do estudo	141
5.7 GENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO.....	145
5.7.1 <i>COX-2/PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)</i>	145
5.7.2 <i>OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1)</i>	147
5.7.3 <i>TNF (Tumor necrosis factor): TNFA e TNFB</i>	148
5.7.4 <i>HSP70 (Heat shock 70kDa protein): HSPA1B e HSPA1L</i>	150
5.7.5 <i>VEGFA (Vascular endothelial growth factor A)</i>	152
5.7.6 <i>IL17F (Interleukin 17F)</i>	155
5.7.7 <i>LGALS3 (Lectin, galactoside-binding, soluble, 3)</i>	156
5.7.8 <i>PHB (Prohibitin)</i>	158
5.7.9 <i>TP53 (Tumor protein p53)</i>	159
6. CONCLUSÕES	164
7. ANEXOS.....	167
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170
APÊNDICE	186

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxas de mortalidade por câncer gástrico no Brasil, no período entre 1980 e 2009, separadas por região e por sexo, (A) em homens e (B) em mulheres 3
- Figura 2.** Ilustração exemplificando os dois subtipos histológicos de adenocarcinoma gástrico, (a) difuso e (b) intestinal de Lauren..... 4
- Figura 3.** Interação entre fatores de risco ambientais/estilo de vida, virulência da bactéria *H. pylori* e suscetibilidade genética do hospedeiro medeiam o tipo e a intensidade de resposta inflamatória que será desenvolvida na mucosa gástrica..... 14
- Figura 4.** Representação gráfica dos principais processos biológicos que apresentaram enriquecimento na análise funcional que avaliou os genes diferencialmente expressos obtidos na comparação entre tumores gástricos de pacientes com melhor ou pior prognóstico..... 15
- Figura 5.** Ilustração dos genes que se localizam no cromossomo 6 e foram selecionados para as análises de haplótipos 31
- Figura 6.** Esquema da estrutura convencional de um gene e a representação da localização gênica das variantes genéticas escolhidas nesse estudo. 46
- Figura 7.** Exemplo de representação dos resultados obtidos pela metodologia de genotipagem por PCR em Tempo Real utilizando-se ensaios TaqMan®. **a)** Amplificação das amostras utilizando sondas para um alelo com fluorocromo VIC (em verde) e para o outro alelo com fluorocromo FAM (em azul) em diferentes amostras. A fluorescência passiva utilizada foi o ROX (em vermelho); **b)** Gráfico mostrando os *clusters* de genótipos: amostras de indivíduos homozigotos para o alelo C em vermelho (genótipo CC), heterozigotos em verde (genótipo AC) e homozigotos para o alelo A em azul (genótipo AA) 54
- Figura 8.** Representação esquemática dos métodos de análise para estudos de associação com polimorfismos, assumindo-se diferentes modelos genéticos..... 56
- Figura 9.** Representação esquemática das análises de associação realizadas em nosso estudo 62
- Figura 10.** Representação dos três blocos de haplótipos (blocos 1 a 3), cujos polimorfismos encontraram-se em desequilíbrio de ligação em nossa amostra total de casos e controles. Entre parênteses está representado o tamanho em kilobases (kb) de cada bloco. Os valores de D' estão apresentados em porcentagem dentro dos losangos e representam o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos (quanto maior o valor de D' , maior é a intensidade da cor vermelha e maior é o desequilíbrio de ligação). 74
- Figura 11.** Representação dos blocos de haplótipos, cujos polimorfismos encontraram-se em desequilíbrio de ligação no grupo de pacientes com câncer gástrico. **(A)** Bloco 1 (polimorfismos de *TNF*), bloco 2 (polimorfismos de *VEGFA*) e **(B)** Bloco 3 (polimorfismos de *COX-2*). Entre parênteses está representado o tamanho em kilobases (kb) de cada bloco. Os valores de D' estão

apresentados em porcentagem dentro dos losangos e representam o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos (quanto maior o valor de D' , maior é a intensidade da cor vermelha e maior é o desequilíbrio de ligação) 99

Figura 12. Curvas de sobrevida (A) global e (B) livre de doença dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico em nosso estudo (N=178), obtidas pelo método de Kaplan-Meier 104

Figura 13. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global considerando-se a amostra total de pacientes diagnosticados com câncer gástrico nesse estudo (N=178), segundo as características anatomopatológicas. A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento; L) Subtipo Histológico 106

Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença considerando-se a amostra total de pacientes diagnosticados com câncer gástrico nesse estudo (N=178). A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento; L) Subtipo Histológico .. 107

Figura 15. Curvas de sobrevida global (A-D) e livre de doença (F-I) estratificadas para os genótipos/alelos do polimorfismo rs909253 do gene *TNFB* considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178), nos Modelos Genéticos de Genótipos (A e F), de Alelos (B e G), Recessivo (C e H) e Dominante (D e I)..... 110

Figura 16. Curvas de sobrevida global (A-D) e livre de doença (F-I) estratificadas para os genótipos/alelos do polimorfismo rs4644 do gene *LGALS3* considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178), nos diferentes Modelos Genéticos: (A e F) Genótipos, (B e G) Alelos, (C e H) Recessivo e (D e I) Dominante 111

Figura 17. Curvas de sobrevida (A) global e (B) livre de doença dos pacientes diagnosticados com subtipo histológico difuso de câncer gástrico em nosso estudo (N=112), obtidas pelo método de Kaplan-Meier 113

Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global, considerando-se a amostra de pacientes com subtipo histológico difuso de câncer gástrico (N=112). A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento 114

Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença, considerando-se a amostra de pacientes com subtipo histológico difuso de câncer gástrico (N=112). A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento..... 115

Figura 20. Curvas de sobrevida global (A-D) e livre de doença (F-I) estratificadas para os genótipos/alelos do polimorfismo rs909253 do gene *TNFB*, considerando-se somente os casos com subtipo histológico difuso de câncer gástrico (N=112), nos diferentes Modelos Genéticos: (A e F) Genótipos, (B e G) Alelos, (C e H) Recessivo e (D e I) Dominante 118

Figura 21. Representação gráfica da rede biológica complexa construída com base nos processos biológicos descritos pelo *Gene Ontology*, ilustrando as interações gênicas, genes co-expressos (roxo), interações físicas entre os produtos proteicos (rosa), similaridades de domínios protéicos (marrom) ou participação de vias biológicas comuns (azul), considerando-se os onze genes investigados nesse estudo (*COX-2/PTGS2*, *OGG1*, *TNFB/LTA*, *TNFA*, *HSPA1L*, *HSPA1B*, *VEGFA*, *IL17F*, *LGALS3*, *PHB* e *TP53*)..... 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa do número de novos casos de câncer (com exceção do câncer de pele não melanoma) no Brasil para o biênio 2016-2017, separado por sexo.....	2
Tabela 2. Descrição dos polimorfismos escolhidos para nosso estudo, incluindo sua nomenclatura padronizada, outros nomes descritos na literatura, o alelo descrito como polimórfico, a exata coordenada cromossômica e o tipo de alteração dependendo da localização gênica	45
Tabela 3. Polimorfismos estudados e detalhes de seus pares de <i>primers</i> , tamanho dos fragmentos amplificados, enzimas de restrição específicas e tamanho dos fragmentos originados após digestão enzimática	48
Tabela 4. Ensaios <i>TaqMan</i> comercialmente disponíveis, utilizados para a detecção dos polimorfismos dos genes <i>VEGFA</i> e <i>COX-2</i> por PCR em Tempo Real	53
Tabela 5. Características gerais da amostra estudada e comparação das variáveis Idade, Gênero, Etnia, Nível educacional, Tabagismo e Etilismo entre controles e casos com câncer gástrico (amostral total e considerando somente casos com o subtipo histológico difuso)	64
Tabela 6. Descrição dos polimorfismos investigados nesse estudo, comparação das frequências genotípicas e alélicas entre casos e controles; descrição das frequências dos alelos polimórficos disponíveis em bancos de dados públicos e resultado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para a amostra total estudada.....	66
Tabela 7. Resultado das associações entre os polimorfismos rs1042522 (<i>TP53</i>), rs699947 (<i>VEGFA</i>) e rs763780 (<i>IL17F</i>) e o câncer gástrico (amostra total) nos diferentes modelos genéticos e o cálculo da razão de chances (<i>Odds ratio</i>), após ajuste para covariáveis associadas independentemente nas análises univariadas	69
Tabela 8. Resultado das associações entre o polimorfismo rs1042522 (<i>TP53</i>) e o câncer gástrico (considerando-se somente os casos com subtipo histológico difuso) nos diferentes modelos genéticos e o cálculo da razão de chances (<i>Odds ratio</i>), após ajuste para covariáveis associadas independentemente nas análises univariadas.....	72
Tabela 9. Associação entre os blocos de haplótipos formados pelos polimorfismos em desequilíbrio de ligação em nossa amostra e o câncer gástrico.....	75
Tabela 10. Polimorfismos e haplótipos associados à suscetibilidade ao câncer gástrico em nosso estudo, considerando a amostra total de casos (N=178) ou estratificada para o subtipo histológico difuso (N=112)	76
Tabela 11. Características anatomopatológicas dos casos com câncer gástrico ao diagnóstico (amostra total e estratificada por subtipo histológico)	77

Tabela 12. Associação entre o subtipo histológico difuso de Lauren e as características anatomopatológicas de pior progressão do câncer gástrico, com respectivos valores de <i>Odds ratio</i>	80
Tabela 13. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs689466 (gene <i>COX-2</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	82
Tabela 14. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs5275 (gene <i>COX-2</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	82
Tabela 15. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs1052133 (gene <i>OGG1</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	83
Tabela 16. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2227956 (gene <i>HSPAIL</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	85
Tabela 17. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs699947 (gene <i>VEGFA</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	86
Tabela 18. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs833061 (gene <i>VEGFA</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	86
Tabela 19. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2010963 (gene <i>VEGFA</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	87
Tabela 20. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs3025039 (gene <i>VEGFA</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	88
Tabela 21. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs4644 (gene <i>LGALS3</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	89
Tabela 22. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs1042522 (gene <i>TP53</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)	90
Tabela 23. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs5275 (gene <i>COX-2</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	91

Tabela 24. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs909253 (gene <i>TNFB</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	93
Tabela 25. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2227956 (gene <i>HSPA1L</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	94
Tabela 26. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs699947 (gene <i>VEGFA</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	95
Tabela 27. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs833061 (gene <i>VEGFA</i>) e o cálculo do <i>Odds Ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	95
Tabela 28. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2010963 (gene <i>VEGFA</i>) nos diferentes modelos genéticos, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)	96
Tabela 29. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs4644 (gene <i>LGALS3</i>) nos diferentes modelos genéticos, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)	97
Tabela 30. Frequências observadas para cada haplótipo, cujos polimorfismos apresentaram desequilíbrio de ligação, na amostra total de pacientes com câncer gástrico.....	100
Tabela 31. Associações significativas observadas entre os haplótipos formados pelos polimorfismos que se encontraram em desequilíbrio de ligação, e as características anatomopatológicas na amostra total de casos com câncer gástrico	100
Tabela 32. Polimorfismos associados a variáveis anatomopatológicas de pior progressão do câncer gástrico e modelos genéticos nos quais as associações foram detectadas, separadamente para a amostra total (N=178) e para os casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	102
Tabela 33. Polimorfismos associados a variáveis anatomopatológicas de melhor progressão do câncer gástrico e modelos genéticos nos quais as associações foram detectadas, separadamente para a amostra total (N=178) e para os casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	103
Tabela 34. Haplótipos associados a variáveis anatomopatológicas de pior progressão do câncer gástrico na amostra total de casos (N=178)	103
Tabela 35. Sobrevida global e livre de doença segundo as características anatomopatológicas no câncer gástrico, considerando a amostra total de casos (N=178)	109
Tabela 36. Curvas de sobrevida global e livre de doença de acordo com os polimorfismos rs909253 de <i>TNFB</i> e rs4644 de <i>LGALS3</i> e o cálculo do <i>Hazard ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos (N=178).....	112

Tabela 37. Sobrevida global e livre de doença segundo as características anatomopatológicas no câncer gástrico, considerando-se somente os casos com subtipo histológico difuso (N=112)	117
Tabela 38. Curvas de sobrevida global e livre de doença de acordo com o polimorfismo rs909253 de <i>TNFB</i> e o cálculo do <i>Hazard ratio</i> para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112).....	119
Tabela 39. Polimorfismos associados às curvas de sobrevida global e livre de doença e modelos genéticos nos quais as associações foram detectadas, separadamente para a amostra total (N=178) e para os casos com subtipo histológico difuso (N=112)	121
Tabela 40. Estimativa de tamanho amostral calculada para o estudo caso-controle para um poder de 70 e 80%, utilizando-se como referência um nível de significância α de 5%, valores de frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos de <i>TP53</i> e <i>VEGFA</i> observadas no grupo de casos e os respectivos valores de <i>Odds Ratio</i> obtidos nos diferentes modelos genéticos, separadamente para a amostra total ou estratificada para o subtipo difuso.....	123
Tabela 41. Estimativa do poder estatístico observado para as análises de associação entre os polimorfismos e as características anatomopatológicas nos diferentes modelos genéticos utilizando-se como referência um nível de significância α de 5%, valores de graus de liberdade e valores de tamanhos de efeito de 20 e 25%, separadamente para a amostra total (N=178) ou estratificada por subtipo histológico difuso (N=112) e intestinal (N=59).....	125
Tabela 42. Polimorfismos do estudo cuja substituição acarreta em alteração de aminoácido e a predição <i>in silico</i> do efeito funcional sobre o produto final	126

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg	arginina
chr	cromossomo
Cis	cisteína
Dr	doutor
et al	e colaboradores
freq	frequência
Gln	glutamina
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
His	histidina
kb	kilobases
Met	metionina
N	número de indivíduos
pb	pares de bases
Pro	prolina
Ref	referência
Ser	serina
Thr	treonina
U	unidade
vs	<i>versus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	microlitro
ng	nanograma
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
%	porcento
χ^2	qui-quadrado
$>$	maior
$\geq$	maior ou igual
$<$	menor
$\leq$	menor ou igual
$=$	igual
s	segundo
L	litro
U	unidade
min	minuto

LISTA DE SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AP-4	Proteína ativadora 4
BER	Reparo por excisão de base
<i>CDH1</i>	E-caderina
CEP	Comitê de Ética
CGCP	Clinical Genome of Cancer Project
COX	Ciclooxigenase
CTO	Centro de Investigação Translacional em Oncologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EUA	Estados Unidos da América
FIGC	Câncer gástrico intestinal familial
GAPPS	Adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago
GO	Gene Ontology
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDGC	Câncer gástrico difuso hereditário
HR	Hazard ratio
HSP	Heat Shock Proteins
HSP70	Heat shock 70kDa protein
HSPA1A	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A
HSPA1B	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B
HSPA1L	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1 like
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira
IL17F	Interleukin 17F
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
INRAD	Instituto de Radiologia
LGALS3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3
LTA	Linfotoxina α

MAF	Minor allele frequency (frequência do alelo polimórfico)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP-2	Metaloproteases de matrix 2
MMP-9	Metaloproteases de matrix 9
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSAIDs	drogas anti-inflamatórias não-esteroidais
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase 1
OR	Odds ratio
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	POLIMERASE CHAIN REACTION
PGH2	Prostaglandina H2
PHB	Prohibitin
PTGS	Prostaglandinas-endoperóxido sintase
RFLP	RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM
RJ	Rio de Janeiro
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SEADE	Sistema Estadual de Análise de Dados
SIGH	Sistema Integrado de Gestão Hospitalar
siRNA	Small interference RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNFA	Tumor necrosis factor A
TNFB	Tumor necrosis factor B
TP53	Tumor protein p53
UCSC	University of California Santa Cruz
UICC	Union for International Cancer Control
UTR	Untranslated region
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

RESUMO

Furuya TK. Associação entre polimorfismos em genes relacionados à resposta inflamatória e a suscetibilidade, progressão e prognóstico do câncer gástrico [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: A persistência de um microambiente cronicamente inflamado no estômago tem sido descrita como um componente crítico tanto para a iniciação, quanto para a progressão tumoral. Além disso, variações genéticas tem demonstrado influenciar na variabilidade interindividual da resposta inflamatória. Desta forma, esse estudo teve como objetivo investigar a associação de polimorfismos em genes relacionados à resposta inflamatória com o risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, com suas variáveis anatomopatológicas e com a sobrevida global e livre de doença em uma amostra da população Brasileira. **MÉTODOS:** Dezesesseis variantes genéticas selecionadas em onze genes (*COX-2*, *OGG1*, *TNFB*, *TNFA*, *HSPAIL*, *HSPA1B*, *VEGFA*, *IL17F*, *LGALS3*, *PHB* e *TP53*) foram genotipadas em 262 indivíduos controles e 178 pacientes diagnosticados com câncer gástrico. As análises de associações genéticas foram realizadas em diferentes modelos (Genótipos, Alelos, Dominante e Recessivo) considerando a amostra total de casos (N=178) e estratificada somente para os casos com o subtipo histológico difuso de Lauren (N=112). Também foi investigado o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos e as análises de associação com os haplótipos formados foram realizadas por meio dos *softwares* Haploview e PLINK. **RESULTADOS:** No estudo caso-controle, indivíduos portadores do alelo Pro do polimorfismo rs1042522 (*TP53*) apresentaram risco cerca de duas vezes maior em desenvolver o câncer gástrico em análise multivariada, sendo esse risco ainda maior quando considerado somente os casos com o subtipo difuso. Por outro lado, a presença do alelo A do polimorfismo rs699947 (*VEGFA*) foi associada com uma proteção para o câncer gástrico. Em relação às variáveis anatomopatológicas, os polimorfismos rs689466 (*COX-2*); rs1052133 (*OGG1*); rs699947, rs833061 e rs2010963 (*VEGFA*); rs4644 (*LGALS3*) e rs1042522 (*TP53*) foram significativamente associados com características de pior progressão da doença, enquanto que rs5275 (*COX-2*); rs2227956 (*HSPAIL*) e rs3025039 (*VEGFA*) foram associados às variáveis de melhor progressão da doença, na amostra total de casos. Também foi observado que o polimorfismo

rs909253 (*TNFB*) foi capaz de predizer uma melhor progressão da doença quando considerado somente os casos com subtipo difuso. Além disso, em relação ao impacto sobre a sobrevida, rs909253 (*TNFB*) foi associado a um melhor prognóstico quando analisadas ambas as curvas de sobrevida global e livre de doença, enquanto que portadores do alelo His do polimorfismo rs4644 (*LGALS3*) apresentaram um pior prognóstico com menor tempo de sobrevida livre de doença. Por fim, nas análises de associação com os haplótipos, identificamos que o haplótipo CTC (formado por rs699947, rs833061 e rs2010963 do gene *VEGFA*), demonstrou ser um fator de maior suscetibilidade ao câncer gástrico. Também foram observadas associações entre o haplótipo GG (*TNFB/TNFA*) e invasão perineural; haplótipo ACG (*VEGFA*) e invasão sanguínea; haplótipo CTC (*VEGFA*) e invasão para outros órgãos; haplótipo GT (rs689466 e rs5275 do gene *COX-2*) e subtipo histológico intestinal. **CONCLUSÕES:** Os resultados desse estudo nos ajudaram a esclarecer o potencial papel desses polimorfismos em genes envolvidos com a modulação da resposta inflamatória na patogênese do câncer gástrico, indicando que variantes genéticas do hospedeiro atuam conjuntamente com outros fatores, influenciando na suscetibilidade, progressão e prognóstico dessa doença.

Descritores: neoplasias gástricas; inflamação; polimorfismo genético; estudos de associação genética; predisposição genética para doença; progressão da doença; análise de sobrevida; prognóstico.

ABSTRACT

Furuya TK. Association between polymorphisms in inflammatory response related-genes and the susceptibility, progression and prognosis of gastric cancer [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

INTRODUCTION: The chronic inflammatory microenvironment in the stomach has been described as a critical component for both tumor initiation and progression. Furthermore, genetic variants have shown to influence the interindividual variations in the inflammatory response. Therefore, we aimed to investigate whether polymorphisms in inflammatory response related-genes were associated with risk for gastric tumor development, clinical outcomes, overall and disease free survival of this disease in a Brazilian population sample. **METHODS:** Sixteen selected genetic variants in eleven genes (*COX-2*, *OGG1*, *TNFB*, *TNFA*, *HSPAIL*, *HSPA1B*, *VEGFA*, *IL17F*, *LGALS3*, *PHB* and *TP53*) were genotyped in 262 control individuals and 178 gastric cancer patients. Genetic association analyses were investigated in different models (Genotype, Allele, Dominant and Recessive) in both total sample (N=178) and stratified for the diffuse histological subtype based on Lauren’s classification (N=112). We also calculated the linkage disequilibrium among the polymorphisms and the haplotype associations were carried out using Haploview and PLINK softwares. **RESULTS:** In the case-control study, rs1042522 (*TP53*) Pro allele carriers presented about 2-fold higher risk for developing gastric cancer in a multivariate analysis and this association was even stronger when analyzing only cases with the diffuse subtype. On the other hand, the presence of A allele of rs699947 (*VEGFA*) was associated with a protection for developing gastric cancer. About the significant associations detected with the clinicopathological features, we found that rs689466 (*COX-2*); rs1052133 (*OGG1*); rs699947, rs833061 and rs2010963 (*VEGFA*); rs4644 (*LGALS3*) and rs1042522 (*TP53*) were able to predict outcomes associated with a worse progression of the disease while rs5275 (*COX-2*); rs2227956 (*HSPAIL*) and rs3025039 (*VEGFA*) were associated with better outcomes in the total sample. We also observed that the polymorphism rs909253 (*TNFB*) was able to predict a better outcome only for the individuals diagnosed with the diffuse subtype. Additionally, regarding the impact on the survival curves, rs909253 (*TNFB*) was associated with a better prognosis when analyzing both the overall and

disease-free survivals while rs4644 (*LGALS3*) His allele carriers presented a worse prognosis with shorter disease-free survival. Finally, concerning the haplotype associations, we found that CTC haplotype (composed by rs699947, rs833061 and rs2010963 of *VEGFA*) showed an association with gastric malignancy. We also observed associations between GG haplotype (*TNFB/TNFA*) and perineural invasion; ACG haplotype (*VEGFA*) and venous vascular invasion; CTC haplotype (*VEGFA*) and invasion to other organs and GT haplotype (rs689466 and rs5275 of *COX-2* gene) and the intestinal histologic subtype. **CONCLUSIONS:** These results helped us to clarify the potential role of these polymorphisms in genes involved in the modulation of the inflammatory response in the pathogenesis of gastric malignancy, highlighting that the host genetic variants act together with other factors to influence in the susceptibility, progression and prognosis of gastric cancer.

Descriptors: stomach neoplasms; inflammation; polymorphism, genetic; genetic association studies; genetic predisposition to disease; disease progression; survival analysis; prognosis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer gástrico

Baseado em estimativas do Projeto GLOBOCAN, cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes pela doença ocorreram no mundo em 2012. O câncer de estômago, também conhecido por câncer gástrico foi apontado como a quinta causa mais comum de câncer (6,8% do total), depois do câncer de pulmão, mama, colorretal e próstata, e foi a 3ª causa de morte pela doença (8,8% do total) nesse mesmo ano. A maior parte dos casos de câncer gástrico (70%) ainda ocorre em países em desenvolvimento e a taxa de incidência é cerca de duas vezes maior no sexo masculino do que no feminino (Ferlay et al, 2015).

No Brasil, dados apresentados pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) estimaram cerca de 600 mil novos casos de câncer para o biênio 2016-2017 e, dentre esses, mais de 20 mil correspondem ao câncer gástrico. Nessas estimativas, que não contemplam os casos de câncer de pele não melanoma, o câncer gástrico aparece como o quarto tipo mais prevalente em homens (6,0%) e o quinto em mulheres (3,7%) (Tabela 1) (INCA, 2016).

Tabela 1. Estimativa do número de novos casos de câncer (com exceção do câncer de pele não melanoma) no Brasil para o biênio 2016-2017, separado por sexo

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

Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2016)

Um estudo nacional estimou as taxas de mortalidade por câncer gástrico em ambos os sexos, entre 1980 e 2009. Houve uma diminuição da mortalidade nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, aumento da mortalidade na região Nordeste e no Norte do país as taxas mantiveram-se estáveis (Figura 1) (Guimaraes, Muzi, 2012).

Figura 1. Taxas de mortalidade por câncer gástrico no Brasil, no período entre 1980 e 2009, separadas por região e por sexo, (A) em homens e (B) em mulheres (Guimaraes, Muzi, 2012)

1.2 Classificações clinicopatológicas do câncer gástrico

Cerca de 90% dos tumores de estômago são malignos e o adenocarcinoma gástrico compreende 95% desse total (Dicken et al, 2005). O adenocarcinoma origina-se das glândulas da camada mais superficial ou da mucosa do estômago enquanto os outros tipos, como linfomas e leiomiomas, originam-se do tecido linfóide e dos músculos ao redor da mucosa gástrica, respectivamente (Karimi et al, 2014).

A classificação mais utilizada para a descrição do câncer gástrico foi proposta em 1965 por Lauren e distingue dois principais subtipos de adenocarcinoma, o difuso e

o intestinal (Lauren, 1965), que diferem com base nas características epidemiológicas, histopatológicas e moleculares (Figura 2).

Figura 2. Ilustração exemplificando os dois subtipos histológicos de adenocarcinoma gástrico, (a) difuso e (b) intestinal de Lauren. As características microscópicas típicas do subtipo difuso incluem a formação de uma massa mucocelular, que muitas vezes se assemelham a anéis de sinete e crescem na mucosa e na parede gástrica com pouca ou nenhuma diferenciação glandular. Por outro lado, o subtipo intestinal é caracterizado pela formação de estruturas glandulares, podendo apresentar as lesões pré-cancerosas sequenciais descritas no Modelo de Correa (Vauhkonen et al, 2006)

O subtipo intestinal apresenta coesão entre as células neoplásicas e forma estruturas glandulares que geralmente sofrem ulceração, acometem pessoas mais velhas e do sexo masculino (Kelley, Duggan, 2003). O crescimento ocorre em expansão ao invés de apresentar um padrão infiltrativo (Dicken et al, 2005), sendo geralmente precedido por uma cadeia sequencial de lesões pré-cancerosas, conhecida como Modelo de Correa: gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia, carcinoma intramucoso (precoce) e neoplasia maligna (Correa, 1988; Correa, Shiao, 1994).

Já o subtipo difuso é ausente de coesão entre as células tumorais e resulta na infiltração e espessamento da parede gástrica sem a formação de estruturas glandulares, sendo mais observado em grupos de pessoas mais jovens, com acometimento

semelhante entre ambos os sexos (Kelley, Duggan, 2003). Os tumores difusos têm aumentado em incidência e exibem desmoplasia com inflamação associada, porém com relativa preservação da mucosa adjacente. Além disso, parecem estar menos relacionados às influências ambientais e estão associados a um pior prognóstico (Dicken et al, 2005). Ao contrário do subtipo intestinal, ele se desenvolve a partir da inflamação crônica sem passar pelos estágios intermediários de gastrite atrófica e metaplasia intestinal (Milne et al, 2009).

Essas diferenças epidemiológicas indicam que os dois subtipos histológicos possuem etiologias distintas. Porém, também há falhas nesse conceito, uma vez que alguns tumores não conseguem ser classificados como intestinal ou difuso e outros possuem características de ambos os subtipos (Lochhead, El-Omar, 2008).

O estômago é dividido em duas principais localizações, que se distinguem por demarcações anatômicas, diferenças histológicas, ou ambas. Tumores nessas diferentes regiões também possuem padrões epidemiológicos e causas distintas: região cárdia ou proximal (de transição entre o esôfago e o estômago) e regiões distais, denominadas não-cárdia (fundo, corpo, piloro e antro) (Karimi et al, 2014).

A descrição do estadiamento das neoplasias gástricas é determinada pela classificação TNM estabelecida pela *Union for International Cancer Control* (UICC) e *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (AJCC, 2010). Esse estadiamento pode ser clínico ou patológico. A avaliação clínica é realizada com base na extensão do tumor, por meio de exames físicos auxiliados por exames radiográficos, endoscópicos e histológicos. A avaliação do TNM patológico (Quadro 1) é efetuada pela análise macro e microscópica do tumor, visando observar a profundidade da invasão, a presença de linfonodos comprometidos e de metástase à distância. A letra “T” determina a extensão do tumor; a letra “N” determina a ausência ou a presença, bem como a extensão das metástases em linfonodos regionais, e “M” estabelece a ausência ou a presença de metástase à distância. O Quadro 2 apresenta a determinação do estadiamento da doença como resultado da combinação das características do TNM.

Quadro 1. Definição do TNM patológico para o câncer gástrico

Tumor primário (T)	
T0	Sem evidência de tumor primário
T1a	Tumor invade a muscular da mucosa
T1b	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor penetra a subserosa
T4a	Tumor invade a serosa
T4b	Tumor invade as estruturas adjacentes
Linfonodos regionais (N)	
N0	Ausência de metástase em linfonodos
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais
N3	Metástase em ≥ 7 linfonodos regionais
Metástase à distância (M)	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: Elaborado com base na classificação do TNM 7ª edição proposta pela UICC/AJCC

Quadro 2. Agrupamento por estadiamento para o câncer gástrico

Estadiamento	Combinação TNM		
0	Tx	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB	T4b	N0 ou N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N2 ou N3	M0
	T4a	N3	M0
IV	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: Elaborado com base na classificação do TNM 7ª edição proposta pela UICC/AJCC

O estadiamento clinicopatológico utilizando o sistema TNM ainda é a principal ferramenta utilizada atualmente pelos clínicos para predizer o prognóstico do câncer gástrico. Porém, muitos pacientes com TNM idênticos frequentemente apresentam desfechos clínicos variáveis, sugerindo que existem fatores adicionais influenciando a progressão da doença. É importante ressaltar que o câncer gástrico é uma doença biologicamente e geneticamente heterogênea, sendo que o mecanismo da carcinogênese ainda é complexo e pouco compreendido do ponto de vista molecular. Inúmeros fatores

agem em paralelo aos eventos moleculares para promover a iniciação, progressão e metástase no câncer gástrico (Baniak et al, 2016).

O câncer gástrico é definido como precoce quando o adenocarcinoma está restrito à mucosa e à submucosa, independente do envolvimento linfonodal. Nesse tipo de câncer, o prognóstico é geralmente favorável, devido à presença pouco frequente de metástase linfonodal ou à distância e a taxa de sobrevida de cinco anos atinge cerca de 95%. A invasão linfonodal ocorre em cerca de 10 a 20% dos casos, porém a metástase linfonodal, relacionada com a profundidade de invasão, está geralmente restrita a poucos nódulos regionais e, nesses casos, a gastrectomia com remoção de linfonodos tem se mostrado suficiente (Uedo et al, 2013).

Por outro lado, o câncer gástrico avançado penetra progressivamente a muscular própria ou a subserosa e a serosa e as estruturas adjacentes (Vecchi et al, 2007). Na ausência de programas de rastreamento, a maior parte dos pacientes é detectada em estágios patológicos avançados, porque os sintomas manifestam-se tardiamente e atrasam o diagnóstico. Esses pacientes possuem uma média de sobrevida de 24 meses (20-30% de sobrevida em cinco anos) em tumores ressecados cirurgicamente, de 8,1 meses após tratamento paliativo e somente de 5,4 meses para doença avançada sem cirurgia (Dicken et al, 2005).

Não é claro se o câncer gástrico precoce e avançado são entidades distintas ou se eles representam estágios progressivos de um mesmo tumor. Evidências clínicas mostram que o câncer gástrico precoce progride na maior parte das vezes para estágios avançados, levando à morte. Porém, ainda não se conhecem as alterações moleculares que poderiam ser capazes de diferenciar esses dois tipos de tumor (Vecchi et al, 2007).

1.3 Fatores de risco etiológicos para o câncer gástrico

Uma série de características já foi previamente associada ao aumento do risco para o câncer gástrico, dentre elas podemos citar um menor nível socioeconômico, alto consumo de sal e comidas conservadas, dieta rica em nitrito ou nitrato, maior índice de massa corpórea, exposição à radiação ionizante, anemia perniciosa, úlcera gástrica, uso de tabaco, consumo de álcool, grupo sanguíneo A e presença de pólipos. Por outro lado, consumo de frutas, verduras, fibras, vitamina C, E, carotenoides e selênio foram associados a uma proteção contra a doença (Kelley, Duggan, 2003; Dicken et al, 2005).

Infecção pela bactéria gram-negativa *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é considerada como um dos principais fatores etiológicos associados à neoplasia gástrica, aumentando o risco em até seis vezes, principalmente devido ao processo inflamatório resultante na mucosa gástrica. Cerca de 75% dos casos de câncer gástrico podem ser atribuídos à infecção por *H. pylori* e, por essa razão, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) a classificou como carcinógeno tipo I em 1994 (Cadamuro et al, 2014).

A infecção por *H. pylori* ocorre ao redor do mundo, mas varia entre os países e dentro de grupos populacionais dentro de um mesmo país, estando diretamente relacionada a condições socioeconômicas. Sua prevalência em adultos de meia idade é de 80% em países em desenvolvimento, quando comparado a 20-50% em países industrializados (Suerbaum, Michetti, 2002). Embora haja evidências de que a infecção por *H. pylori* esteja associada ao câncer gástrico, somente cerca de 1 a 2% dos indivíduos infectados desenvolvem o câncer. Cerca de 80% dos indivíduos permanecem assintomáticos e as variações nos genes de virulência das cepas (*cagA*, *vacA*, *babA*) parecem ser, em parte, responsáveis pela patogenicidade da bactéria (Wu et al, 2005).

Embora a infecção por *H. pylori* aumente significativamente o risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, os mecanismos exatos associados à transformação maligna necessitam ser elucidados, mas acredita-se que estejam relacionados à ação combinada entre a virulência do microrganismo, a permissividade do ambiente e a suscetibilidade genética do hospedeiro (Vauhkonen et al, 2006).

1.4 Inflamação e câncer gástrico

A indução da inflamação no câncer gástrico parece estar relacionada à presença de *H. pylori*. Durante a infecção pela bactéria, o sistema imune do hospedeiro monta uma resposta robusta que integra constituintes do sistema imune inato e adaptativo, bem como geração de uma resposta humoral (Hardbower et al, 2014). Acredita-se que habilidade de *H. pylori* em evadir ao sistema imune e a persistência da infecção levem a uma inflamação crônica, com maior dano tecidual, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, lesões ao DNA e instabilidade genômica, que favorecem a transformação neoplásica em hospedeiros suscetíveis (Hardbower et al, 2014).

Recentemente a inflamação foi incluída como complementação da lista dos *hallmarks* do câncer, proposta inicialmente por Hanahan e Weinberg em 2000, contendo a descrição dos mecanismos biológicos que são adquiridos durante o desenvolvimento do tumor (Hanahan, Weinberg, 2011). Projetada inicialmente para lutar contra infecções e curar feridas, a persistência da resposta inflamatória acaba facilitando a aquisição de características que levam à promoção do tumor. Além disso, a evasão ativa das células tumorais contra o ataque e eliminação pelo sistema imune evidencia o papel duplo desse sistema que ao mesmo tempo antagoniza e promove o desenvolvimento e progressão do câncer (Hanahan, Weinberg, 2011).

A resposta inflamatória possui importante papel regulatório em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, desde a iniciação, promoção, transformação maligna, invasão e metástase. Embora haja particularidades para cada tipo de tumor, um microambiente inflamatório parece ser um componente crítico para a tumorigênese (Grivennikov et al, 2010). A inflamação compromete a integridade tecidual e direciona a um processo de múltiplos passos que altera alvos e vias cruciais para a homeostase do tecido normal (Wu et al, 2005).

Durante a resposta de inflamação aguda, os macrófagos, uma subclasse de células inflamatórias, são tipicamente polarizados para M1 (macrófagos classicamente ativados) com função de eliminação de patógenos via atividade microbicida intracelular e secreção de mediadores inflamatórios que promovem uma resposta Th1. Por outro lado, os macrófagos M2, ou alternativamente ativados, promovem a resolução da inflamação, cicatrização de feridas e remodelação tecidual secretando componentes da matriz extracelular e efetores anti-inflamatórios que promovem uma resposta Th2 (Martinez et al, 2009; Cassetta et al, 2011). De maneira geral, o fenótipo M1 está relacionado à resposta pró-inflamatória, citotóxica e anti-tumoral enquanto que M2 está associado à imunossupressão e progressão tumoral (Chanmee et al, 2014). A atividade contraditória pró e anti-inflamatória, imunogênica e tolerogênica, de destruição e reparo tissular demonstram a heterogeneidade fenotípica dos macrófagos, sendo que a sua diferenciação e função estão intimamente associadas ao seu estado de polarização, que é direcionado pelo microambiente (Cassetta et al, 2011).

Estudos mostram que a polarização dos macrófagos parece ter importante papel no desenvolvimento do câncer gástrico. Enquanto a mucosa gástrica de indivíduos infectados com *H. pylori* apresentou um balanço equilibrado de polarização M1/M2 de

macrófagos, na gastrite atrófica houve um aumento de expressão em iNOS (óxido nítrico sintase induzida), indicando uma polarização dos macrófagos para M1 (Quiding-Jarbrink et al, 2010). Acredita-se que a gastrite atrófica seja uma lesão precursora ao câncer, como parte de uma série de eventos, que aparentemente antecipam o desenvolvimento da doença, em que a mucosa gástrica é acometida por uma gastrite superficial, evolui para uma gastrite crônica atrófica, metaplasia, displasia até gerar o carcinoma (Correa, 1988).

Uma inflamação crônica com persistência de polarização de macrófagos para M1 cria um microambiente pró-inflamatório que está associado à iniciação tumoral (Lu et al, 2006). Uma vez que o tumor esteja estabelecido, a resposta inflamatória associada tem um efeito paradoxal, criando um microambiente pró-tumorigênico, que favorece a sua progressão e auxilia a neoplasia incipiente a adquirir as demais características para a evolução do câncer (Hanahan, Weinberg, 2011). O microambiente tumoral direciona a polarização de macrófagos de um estado M1 para um fenótipo M2, anti-inflamatório, pró-angiogênico e pró-tumoral (Chanmee et al, 2014). A inflamação associada ao tumor contribui para a progressão fornecendo moléculas bioativas para o microambiente tumoral, como fatores de crescimento que mantem a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pró-angiogênicos e enzimas remodeladoras da matriz extracelular, facilitando a angiogênese, invasão e metástase, além de sinais de indução que levam à ativação da transição epitélio-mesênquima (Hanahan, Weinberg, 2011).

1.5 Fatores de risco genéticos para o câncer gástrico

A maior parte dos casos de câncer gástrico é esporádica, sem um componente hereditário clássico, porém em cerca de 10% dos casos ocorre agregação familiar. Casos hereditários compreendem de 1 a 3% dos acometimentos e incluem três principais síndromes com características de transmissão autossômica dominante: câncer gástrico difuso hereditário (HDGC), adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago (GAPPS) e câncer gástrico intestinal familiar (FIGC) (Oliveira et al, 2015).

O HDGC tem sido bem caracterizado e associado principalmente a alterações genéticas que inativam o gene *CDH1* (que codifica a E-caderina), como mutações e deleções, perda de heterozigose e até mesmo modificações epigenéticas via

hipermetilação do promotor gênico. Porém, em mais de dois terços dos casos essas mutações em *CDHI* não foram identificadas e o componente genético permaneceu sem explicação (Carneiro et al, 2010). O GAPPs foi identificado em 2012 e é caracterizado por polipose de glândulas fúndicas, que estão restritas ao estômago proximal, enquanto que o FIGC tem sido observado em muitas famílias com tipo intestinal de câncer gástrico, mas ambas permanecem sem causa genética conhecida (Oliveira et al, 2015). Além disso, o câncer gástrico faz parte do espectro de tumores em várias outras síndromes de câncer hereditário, cujo risco precisa ser levado em consideração: Síndrome de Lynch, Li-Fraumeni, polipose adenomatosa familiar, Peutz-Jeghers, polipose juvenil, síndromes hereditárias de mama e ovário (Oliveira et al, 2015).

Com exceção das síndromes hereditárias, a maior parte dos casos de câncer são doenças multifatoriais e poligênicas, na qual o efeito de predisposição de um fator genético individual é muito pequeno (Yoshida et al, 2010). A suscetibilidade individual será determinada pela combinação entre fatores ambientais, estilo de vida e fatores genéticos. A descoberta de genes relacionados à suscetibilidade de uma doença pode nos auxiliar na identificação de grupos de maior risco e, tão importante quanto, pode contribuir na elucidação das vias moleculares envolvidas na sua patogênese, levando ao desenvolvimento de alvos moleculares para prevenção (Yoshida et al, 2010).

Embora difícil devido à heterogeneidade e complexidade do câncer gástrico, estudos recentes têm investigado novas classificações moleculares com base nos perfis de expressão gênica desses tumores. Em 2014, um consórcio formado pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) propôs uma classificação molecular para a doença, baseada no perfil de expressão gênica de 295 adenocarcinomas primários. Quatro subtipos moleculares foram propostos para o câncer gástrico nesse estudo: casos positivos para o vírus Epstein-Barr, positivos para instabilidade microssatélite, genomicamente estáveis e com instabilidade cromossômica (TCGA, 2014).

Além dos estudos de expressão gênica, nas últimas décadas tem-se investido muito na identificação de fatores de suscetibilidade genética para diferentes tipos de câncer e outras doenças complexas. Nesse contexto, variações mais frequentes na sequência do DNA como polimorfismos de base única (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) em genes candidatos têm sido importantes alvos em estudos de associação, na tentativa de buscar uma melhor compreensão da patogênese de uma doença e de fornecer pistas visando melhorar sua prevenção, diagnóstico e tratamento

(HapMap Consortium, 2005). Para auxiliar nessa busca, inúmeros consórcios foram criados com o intuito de gerar e catalogar informações sobre a quantidade, localização, tipo e frequência das variantes genéticas comuns nas sequências do genoma humano, em diferentes grupos étnicos, como o Consórcio Internacional HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o Projeto 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org/>), iniciados em 2002 e 2008, respectivamente.

Estudos de associação em larga escala (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) “livres de hipótese”, envolvendo vários tipos de câncer, iniciaram em meados de 2007, porém requerem um número amostral muito grande de casos e controles para identificar fatores genéticos com pequeno efeito (Yoshida et al, 2010).

Como os estudos em larga escala permanecem inviáveis devido ao alto custo, ainda são realizados estudos caso-controle dependentes de conhecimento prévio e hipóteses que nos sugerem genes e variantes candidatas relevantes para a busca por fatores de suscetibilidade genética para doenças complexas. Esses genes são escolhidos baseando-se na função conhecida ou predita, fundamentados por estudos experimentais e testes *in silico* ou ainda se baseando em estudos que tenham associado a variante genética previamente à doença avaliada.

Inúmeros estudos de associação têm sido conduzidos na tentativa de se identificar fatores de risco genéticos para o câncer gástrico. Muitos deles focaram em polimorfismos em genes envolvidos com a proteção da mucosa contra *H. pylori*, metabolismo de carcinógenos, síntese de desoxinucleotídeos, reparo de DNA e genes supressores de tumor (Wadhwa et al, 2013). Uma vez que existe a ideia de que o câncer gástrico seja promovido pela inflamação crônica em resposta à presença de *H. pylori*, genes envolvidos na resposta imune parecem ser bons candidatos para investigação (Schneider et al, 2008).

A discrepância que existe entre a porcentagem de indivíduos infectados com *H. pylori* e que desenvolvem o câncer (cerca de 1 a 2%) pode ser explicada pela complexa interação entre os diversos fatores de risco associados à doença, como variabilidade da virulência das diferentes cepas de *H. pylori*, fatores ambientais, variabilidade genética do hospedeiro, que contribuem de maneiras diferentes e modulam o nível de resposta inflamatória do hospedeiro e o risco para o desenvolvimento do câncer gástrico (Figura 3) (Wu et al, 2005). Dentro de um microambiente inflamatório, coexistem influências pró e anti-inflamatórias e o balanço entre elas direciona a magnitude da resposta

inflamatória. Dessa forma, indivíduos portadores de variantes genéticas que promovam uma resposta mais pró-inflamatória poderiam facilitar um ambiente cronicamente inflamado no estômago, favorecendo a carcinogênese (McLean, El-Omar, 2009).

Figura 3. Interação entre fatores de risco ambientais/estilo de vida, virulência da bactéria *H. pylori* e suscetibilidade genética do hospedeiro medeiam o tipo e a intensidade de resposta inflamatória que será desenvolvida na mucosa gástrica (Modificado de Wu et al, 2005)

Além de serem investigadas como possíveis fatores de suscetibilidade a uma determinada doença, o papel de variantes genéticas como marcadores de progressão e prognóstico do câncer gástrico também tem sido estudado. Conforme compreendemos mais sobre a biologia do tumor e sobre o microambiente em que está inserido, tem sido possível buscar marcadores moleculares capazes de predizer o prognóstico. Isto representa um grande avanço, visto que o prognóstico ainda baseia-se em variáveis clássicas como estadiamento patológico e, além dele, outros fatores clinicopatológicos como grau de diferenciação, tamanho, localização do tumor, invasão vascular e linfática, idade de acometimento, gênero e alguns marcadores tumorais (Dicken et al, 2005). É preciso lembrar que os tumores são heterogêneos e mesmo quando possuem

mesmo estadiamento ou características histopatológicas semelhantes, os comportamentos são diferentes.

Da mesma forma que poderiam estar associados à promoção tumoral, os polimorfismos relacionados a processos inflamatórios e resposta imune poderiam influenciar no comportamento do tumor, na agressividade do fenótipo, afetando a patogênese e o curso da doença e, poderiam ser utilizados para prever o comportamento clínico ou biológico do tumor, identificando subgrupos de maior risco baseando-se nas diferenças na história natural da doença.

Na busca por perfis moleculares de significado prognóstico, um estudo transcriptômico conduzido por nosso grupo, utilizando uma subgrupo de amostras do atual projeto, demonstrou uma diminuição da expressão de genes de vias de resposta inflamatória e imunológica em pacientes com pior prognóstico do câncer gástrico (Pasini et al, 2014). Esses resultados evidenciam que uma desregulação/desbalanço na coordenação das expressões de genes nessas vias de relevância parece comprometer a progressão da doença (Figura 4).

Figura 4. Representação gráfica dos principais processos biológicos que apresentaram enriquecimento na análise funcional que avaliou os genes diferencialmente expressos obtidos na comparação entre tumores gástricos de pacientes com melhor ou pior prognóstico (Pasini et al, 2014). Em destaque estão representadas as vias de respostas inflamatória e imune, que apareceram como dois dos principais processos biológicos enriquecidos quando avaliados os transcritos com diminuição de expressão; GO: *Gene Ontology*

Nesse sentido, levantamos a hipótese de que variações em genes que regulam a resposta inflamatória do hospedeiro poderiam contribuir tanto para a predisposição ao câncer gástrico e, uma vez instalado o tumor, essas variantes também poderiam influenciar na progressão e prognóstico da doença. Dessa forma, selecionamos para investigação alguns polimorfismos em genes candidatos que possuem papel regulatório descrito na resposta inflamatória. Essas variantes genéticas poderiam atuar interferindo na resposta do hospedeiro frente aos insultos causados por *H. pylori* na mucosa gástrica, favorecendo uma resposta pró-inflamatória exacerbada/crônica ou promovendo uma resposta anti-inflamatória defeituosa, reduzindo a resposta de reparo e danos secundários à inflamação e, dessa forma, poderiam contribuir para a iniciação ou progressão do câncer gástrico. Os genes e os respectivos polimorfismos selecionados para o presente estudo estão representados na Tabela 2, na seção de Metodologia. A seguir, uma breve descrição sobre os genes escolhidos nesse estudo.

1.5.1 COX-2/PTGS2 (*Cyclooxygenase-2/prostaglandin-endoperoxide synthase 2*)

As ciclooxigenases (COXs), também conhecidas como PTGS (prostaglandinas-endoperoxído sintase), são enzimas chave que medeiam a conversão de ácido aracônico em prostaglandina H₂ (PGH₂). PGH₂ é uma molécula precursora da síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, importantes reguladores de processos biológicos como inflamação, resposta imune, proliferação celular e angiogênese, com papéis cruciais para o desenvolvimento e progressão tumoral (Zhang et al, 2005). Essas enzimas possuem grande relevância funcional e farmacológica, atuando como principais alvos de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (NSAIDs) disponíveis no mercado, utilizadas no tratamento de sintomas de inflamação e dor (Agundez et al, 2014).

A família COX compreende duas isoformas principais: COX-1, que é constitutivamente expressa e está envolvida na homeostase de uma série de processos fisiológicos; e COX-2, que está ausente na maior parte dos tecidos normais, mas é rapidamente induzida por respostas inflamatórias, fatores de crescimento, citocinas e carcinógenos (Dong et al, 2010). O gene *PTGS2* que codifica para COX-2 foi mapeado em 1q25.2–25.3 e consiste de 9 introns e 10 éxons (Li et al, 2012).

COX-2 está envolvida em vias de resposta inflamatória, com papel importante no microambiente da tumorigênese gástrica (Cheng, Fan, 2013). Estudos *in vivo* e *in*

vitro indicaram haver uma relação direta entre infecção da mucosa gástrica por *H. pylori* e aumento da expressão de *COX-2*, sugerindo que a síntese de *COX-2* possa ser um dos fatores que medeiam a inflamação e a promoção da neoplasia associada a *H. pylori* (Romano et al, 1998; Fu et al, 1999; Xiao et al, 2001). Além disso, *COX-2* parece estar intimamente relacionada com o desenvolvimento e progressão do câncer gástrico, visto que aparece pouco expressa na mucosa gástrica normal, mas possui um aumento de expressão de acordo com os estágios da progressão do câncer, desde as lesões pré-cancerosas até o estabelecimento do tumor maligno (Wang et al, 2014).

Maiores níveis de *COX-2* também já foram associados a uma série de características histopatológicas, como metástase, profundidade de invasão, comprometimento linfonodal e estadió clínico avançado da doença, indicando um comportamento mais agressivo do tumor (Cheng, Fan, 2013).

Estudos funcionais tem demonstrado que *COX-2* parece atuar na carcinogênese gástrica por meio da promoção da proliferação celular, inibição da apoptose, indução de angiogênese e metástase linfática, promoção de invasão e metástase e imunossupressão (Cheng, Fan, 2013). Nesse contexto, diversos estudos têm sido conduzidos para investigar o uso de inibidores de *COX-2* na quimioprevenção e tratamento do câncer gástrico (Wang et al, 2014).

Muitos polimorfismos foram descritos em *COX-2*, porém nosso estudo focou em rs689466 e rs5275, localizados na região promotora e 3'-UTR (do inglês, *untranslated region*), respectivamente, pois parecem ter significado funcional, afetando a transcrição ou estabilidade do RNA mensageiro (RNAm), modulando a resposta inflamatória e contribuindo para a variação individual na suscetibilidade ao câncer (Zhang et al, 2005).

A região promotora do gene *COX-2* possui sítios de ligação e pode ser regulado transcricionalmente por c-MYB (Ramsay et al, 2000), um fator de transcrição importante no sistema gastrointestinal, regulando genes envolvidos com a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Weston, 1998). O alelo A do SNP rs689466 da região promotora de *COX-2* cria um sítio de ligação para c-MYB, resultando em aumento da atividade transcricional do gene (Zhang et al, 2005).

A variação rs5275, localizada no éxon 10 e que codifica para a região 3'-UTR do gene, parece regular a expressão de *COX-2* por meio da regulação pós-transcricional mediada por microRNA (Moore et al, 2012). Indivíduos portadores do alelo T possuem um sítio de ligação para miR-542-3p, que promove a degradação do RNAm, enquanto

que o alelo C interfere na ligação desse microRNA ao transcrito, levando à sua estabilidade (Moore et al, 2012).

Esses resultados indicam que esses polimorfismos poderiam contribuir para uma expressão diferencial de *COX-2* na mucosa gástrica e, conseqüentemente, poderiam interferir no grau de inflamação e de variabilidade interindividual para a suscetibilidade e progressão do câncer gástrico. Os resultados ainda são contraditórios no que diz respeito ao envolvimento de ambos os polimorfismos com o risco para o desenvolvimento dessa neoplasia (Shibata et al, 2008; Dong et al, 2010; Li et al, 2012) e, dessa forma, merecem ser melhor investigados.

1.5.2 *OGG1* (8-oxoguanine DNA glycosylase 1)

Como descrito anteriormente, uma série de fatores como consumo de sódio, infecção por *H. pylori* e cigarro são capazes de induzir inflamação na mucosa gástrica. O infiltrado inflamatório aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem levar a lesões no DNA, como a formação de 8-oxoguanina e, dessa forma, polimorfismos em enzimas responsáveis pelo reparo do DNA poderiam influenciar na capacidade de reverter as conseqüências do dano oxidativo (Karahalil et al, 2012).

O gene *OGG1* localiza-se em 3p25 e codifica para uma enzima de reparo por excisão de base (BER) que repara essas lesões de 8-oxoguanina no DNA. O polimorfismo rs1052133 acarreta em uma substituição de uma serina (Ser) por uma cisteína (Cis) no códon 326 e foi previamente associado à suscetibilidade aumentada a diversos tipos de câncer, incluindo gástrico (Karahalil et al, 2012).

Outro estudo observou maior prevalência desse polimorfismo em pacientes com lesão pré-cancerosa e com câncer gástrico em relação aos controles, além de observar uma associação entre a presença do alelo G (Cis) e maiores níveis de 8-oxiguanina na mucosa (Farinati et al, 2008). Esses resultados sugeriram que a variante possa comprometer a atividade enzimática de OGG1, reduzindo o reparo de danos ao DNA no estômago, atuando como importante fator de risco para o câncer gástrico.

Para complementar esses resultados, experimentos funcionais utilizando linhagens celulares portadoras do genótipo homozigoto para Cis demonstraram que essas apresentaram maior instabilidade genética, além de atividade basal da enzima quase duas vezes menor em relação às células portadoras do genótipo selvagem

(Bravard et al, 2009). Além disso, esse efeito foi dependente do estado *redox* da célula, visto que a utilização de agentes redutores aumentou a atividade enzimática dessas linhagens (Bravard et al, 2009). Os autores sugeriram que as consequências fenotípicas dependeriam do estresse oxidativo do ambiente em que a célula estivesse inserida (Bravard et al, 2009), sendo esse um dado de extrema relevância ao pensarmos no microambiente inflamatório gástrico causado pela infecção por *H. pylori*, com intensa produção de espécies reativas de oxigênio (Hardbower et al, 2014). Dessa forma, a sensibilidade da variável Cis frente ao estado *redox* do microambiente poderia sugerir a existência de uma variabilidade interindividual na atividade da enzima e, consequentemente, no desenvolvimento e progressão do câncer gástrico.

Além da sua participação clássica na maquinaria de reparo do DNA, OGG1 parece ter papel modulador no sistema imune e inflamatório. Um estudo nocauteou o gene *OGG1* em três modelos distintos de inflamação e observou que a ausência desse gene reduziu a resposta inflamatória e foi protetora para os animais (Mabley et al, 2005). Além disso, outro estudo demonstrou que, após infecção por *H. pylori*, animais nocautes para *OGG1* desenvolveram uma gastrite mais leve, além de apresentarem uma proteção contra a inflamação e genotoxicidade quando comparado aos animais selvagens (Touati et al, 2006).

Selecionamos esse polimorfismo como candidato para nosso estudo, visto que esse gene possui funções importantes relacionadas à carcinogênese gástrica, com papel importante tanto na inflamação quanto na maquinaria de reparo de DNA e que rs1052133 parece comprometer a atividade enzimática da proteína.

1.5.3 TNF (*Tumor necrosis factor*): *TNFA* e *TNFB*

Os genes *TNFA* e *TNFB* (ou linfotoxina α , *LTA*) estão localizados em *tandem* no mesmo *cluster* gênico em 6p21.3, dentro do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe III, separados por 1100pb. Os fatores TNF possuem atividades pró- e anti-inflamatórias dependendo dos efeitos sobre o metabolismo de vários tipos celulares, seu estado de ativação, sobrevivência celular (Makhatadze, 1998). Essas duas citocinas são produzidas por diferentes células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). TNF- α é produto de macrófagos ativados, células T, B e *natural-killer* e TNF- β parece ser produzido por linfócitos T ativados (Messer et al, 1991).

Todos esses processos podem ser influenciados por alterações na regulação da expressão desses genes, bem como modificações estruturais da proteína. Embora vários polimorfismos capazes de regular a transcrição e produção de *TNF- α* já tenham sido descritos, o mais estudado é o rs1800629, que ocasiona uma troca de G para A na posição -308 do promotor gênico (Zhu et al), acarretando em maior atividade transcricional do gene, em comparação ao alelo selvagem (Wilson et al, 1997). Outro polimorfismo muito estudado, localizado na posição 252 do primeiro intron do gene *TNFB* (rs909253), também foi associado previamente com superexpressão de *TNFB* (Messer et al, 1991), possivelmente expondo a mucosa gástrica a maiores danos celulares, modificando a gravidade e/ou duração dos processos inflamatórios.

Por estarem envolvidas com uma grande variedade de respostas inflamatórias, essas citocinas têm sido relacionadas ao desenvolvimento do câncer gástrico, com alguns dados inconclusivos na literatura. Nesse sentido, duas metanálises confirmaram a associação entre esses polimorfismos de *TNFA* e *TNFB* com o risco aumentado para esse tipo de câncer em Caucasianos e Asiáticos, respectivamente (Xu et al, 2013; Zhu et al, 2014).

1.5.4 HSP70 (*Heat shock 70kDa protein*): *HSPA1B* e *HSPA1L*

Proteínas do choque térmico (do inglês, *Heat Shock Proteins* – HSP) são proteínas de estresse altamente conservadas, induzidas por choque térmico, fatores estressores ou condições desfavoráveis, como infecção, inflamação, isquemia ou processos carcinogênicos (Ferrer-Ferrer et al, 2013).

HSPs geralmente estão superexpressas na carcinogênese e estão envolvidas em processos de proliferação celular, diferenciação, invasão, metástase, morte e reconhecimento pelo sistema imune. Existem hipóteses de que HSPs possam ser induzidas pelas características fisiopatológicas do microambiente tumoral (como baixa glicose, pH e oxigênio) e que elas estejam relacionadas às alterações genéticas associadas à progressão tumoral. Além disso, proteínas com conformação alteradas (como oncoproteínas) poderiam também induzir a resposta das HSPs (Ciocca, Calderwood, 2005).

As HSPs de mamíferos foram classificadas de acordo com seu peso molecular, sendo a HSP70 (70-kD) uma chaperona codificada por três genes (*HSPA1A/HSP70-1*,

HSPA1L/HSP70-HOM e *HSPA1B/HSP70-2*), localizados no MHC de classe III no cromossomo 6 (Ferrer-Ferrer et al, 2013).

O estudo de variantes genéticas como potenciais moduladores da atividade das HSP70 tem identificado fatores de risco genéticos para o câncer gástrico. Por exemplo, o polimorfismo +1267A>G (rs1061581) do gene *HSPA1B* acarreta em uma substituição silenciosa em uma região codificante. O genótipo heterozigoto foi previamente associado ao risco aumentado para câncer gástrico (Ferrer-Ferrer et al, 2013), porém o genótipo AA também já foi previamente descrito com efeito protetor (Shibata et al, 2009). Embora não haja alteração da sequência de aminoácidos, um estudo detectou diferentes níveis do seu transcrito em células mononucleares de sangue periférico após indução por choque térmico, com menores níveis em homozigotos para o alelo polimórfico em relação aos portadores do alelo selvagem (Pociot et al, 1993).

O polimorfismo +2437T>C (rs2227956) do gene *HSPA1L* corresponde a uma troca do aminoácido metionina (Met) por treonina (Thr) na posição 493, que afeta a eficiência da proteína diminuindo a força das interações hidrofóbicas entre essa chaperona e a proteína alvo (Milner, Campbell, 1992). O alelo C foi previamente descrito como protetor contra o risco para o desenvolvimento do câncer gástrico (Ferrer-Ferrer et al, 2013).

Dessa maneira, sugere-se que modificações na proteína ou na região codificante desses genes tenham uma importante participação na maneira com que as HSPs atuam frente a um estímulo estressor e/ou inflamatório, modulando o risco para desenvolvimento do câncer gástrico ou de alguns de seus subfenótipos.

1.5.5 VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*)

VEGFA (também referido somente como VEGF) possui inúmeras funções descritas, como aumento da permeabilidade vascular, indução da proliferação e migração de células endoteliais, reprogramação da expressão gênica, promoção da sobrevivência de células endoteliais, prevenção da senescência e indução de angiogênese (Dvorak, 2002). Sua expressão pode ser ativada por uma série de efetores como hormônios, fatores de crescimento e citocinas, porém, a hipóxia ainda é considerada o maior regulador da sua transcrição (Klagsbrun, D'Amore, 1996). Ao se ligar a seu receptor em células endoteliais, VEGF ativa vias de transdução de sinal

intracelulares que medeiam a angiogênese e a permeabilidade vascular (Watson et al, 2000). A formação de novos vasos é um pré-requisito para o desenvolvimento, crescimento e progressão de tumores sólidos, pois além de fornecerem oxigênio e nutrientes ao tumor, facilitam a saída das células tumorais para a circulação, promovendo a metástase (Watson et al, 2000). Nesse sentido, inúmeras terapias visando a inibição da angiogênese tem sido propostas na terapia antitumoral, a exemplo do bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGF (Aprile et al, 2015).

Altos níveis de VEGF, intratumoral e/ou circulante têm sido observados em inúmeros tipos de câncer, além de estarem geralmente associados a um pior prognóstico (Dvorak, 2002). No câncer gástrico, inúmeros trabalhos detectaram níveis aumentados de VEGF no tecido tumoral (Maeda et al, 1996; Liu et al, 2012; Zhao et al, 2012). Entretanto, isso não ocorre somente em estágios avançados da doença, mas também foi observado em lesões pré-malignas como gastrite atrófica crônica e metaplasia intestinal, sugerindo sua participação no processo de carcinogênese gástrica (Feng et al, 2002).

Além da angiogênese, VEGF também medeia a inflamação, sendo dois processos integrados em inúmeras condições fisiológicas e patológicas, incluindo o tumor (Shaik-Dasthagirisahab et al, 2013). VEGF é capaz de promover processos inflamatórios por meio da mobilização e extravasamento vascular de leucócitos. Além disso, um aumento das concentrações de VEGF também já foi detectado em uma série de doenças inflamatórias (Jelkmann, 2001). Embora sua ação primária seja em células endoteliais, VEGF é capaz de interagir com inúmeros tipos celulares que expressam seus receptores, incluindo células do sistema imune, estimulando por exemplo a quimiotaxia de monócitos/macrófagos (Dvorak, 2002).

Acredita-se que a angiogênese seja capaz de manter um estado de inflamação crônica por meio do transporte de células inflamatórias, do fornecimento de nutrientes e oxigênio para o tecido inflamado em proliferação. Além disso, os macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, como parte do microambiente estromal local, possuem papel importante na alteração de uma resposta inflamatória aguda para uma inflamação crônica e persistente (Marrelli et al, 2011).

Visto que parece existir uma interação bem orquestrada entre inflamação e angiogênese, VEGF nos pareceu um bom alvo de investigação na busca por marcadores genéticos de suscetibilidade e progressão do câncer gástrico. O gene que codifica para *VEGF* está localizado no cromossomo 6p12-21 e compreende 8 exons separados por 7

íntrons, que sofrem *splicing* alternativo, codificando para uma família de proteínas (Tischer et al, 1991; Vincenti et al, 1996). Selecionamos para esse estudo quatro polimorfismos funcionais bem descritos em *VEGFA* e que já foram previamente associados com alterações na sua expressão, podendo potencialmente contribuir para o desenvolvimento e progressão diferencial do câncer gástrico dependendo do genótipo.

O polimorfismo -2578C>A (rs699947) está localizado na região promotora de *VEGF* (Ke et al, 2008). O genótipo CC foi associado com uma menor expressão da proteína em câncer de pulmão de células não-pequenas e com menor densidade vascular em comparação com o genótipo CA, sugerindo um melhor curso clínico para indivíduos portadores desse genótipo (Koukourakis et al, 2004).

Outro polimorfismo localizado na região promotora escolhido para o nosso estudo foi o -460T>C (rs833061), também conhecido por -1498T>C e que tem sido associado à expressão diferencial da proteína em diferentes tipos de tumores, embora ainda haja inconsistências entre os estudos (Balasubramanian et al, 2007; Cacev et al, 2008; Steffensen et al, 2010; Chen et al, 2011; Zablorna et al, 2013). No câncer gástrico, foi observado que o genótipo TC ou CC estava associado a um pior prognóstico em pacientes em estádios iniciais da doença (Kim et al, 2007).

O polimorfismo +405G>C ou -634G>C (rs2010963), está localizado na região 5'-UTR (do inglês, *untranslated region*) e o genótipo GG foi associado a maiores níveis de VEGF (Watson et al, 2000; Oh et al, 2013). Esse polimorfismo afeta a atividade transcricional do gene, possivelmente por alterar o sítio de ligação para o fator de transcrição MZF1, levando ao aumento da produção de VEGF em células mononucleares do sangue periférico em resposta a lipopolissacarídeos de uma maneira dose-dependente do alelo G, com homozigotos GG apresentando maiores níveis da proteína, seguido de níveis intermediários em indivíduos GC e menores níveis em portadores do genótipo CC (Watson et al, 2000). Além disso, o haplótipo composto pelos alelos -460C/+405G também foi associado a uma maior atividade promotora basal e maior expressão de VEGF *in vitro* (Stevens et al, 2003).

Por fim, escolhemos o polimorfismo rs3025039 da região 3'-UTR (éxon 8) do gene, sendo que o alelo T desse polimorfismo foi associado à diminuição dos níveis de VEGF (Renner et al, 2000; Krippel et al, 2003; Zhai et al, 2007), possivelmente pela perda de um potencial sítio de ligação para a proteína ativadora 4 (AP-4) (Krippel et al, 2003).

O estudo desses polimorfismos em *VEGF* é muito relevante para identificar possíveis marcadores prognósticos no câncer gástrico. Além disso, novos estudos têm sido conduzidos na tentativa de verificar se esses polimorfismos também poderiam atuar como marcadores preditivos de eficácia e toxicidade das novas terapias anti-angiogênicas que vêm sendo desenvolvidas no câncer, utilizando como alvos terapêuticos as vias envolvidas com VEGF (Eng, Liu, 2013).

1.5.6 *IL17F* (Interleukin 17F)

As interleucinas pertencem a uma família de citocinas, que asseguram o correto e efetivo funcionamento do sistema imune de um organismo. Elas são sintetizadas predominantemente por células T, monócitos, macrófagos e células endoteliais e possuem várias funções como facilitar a comunicação entre as células imunes, controlar genes e fatores de transcrição, controlar a inflamação, diferenciação, proliferação e secreção de anticorpos. Qualquer desregulação nas vias envolvendo as interleucinas podem gerar danos ao DNA, produção excessiva de fatores indutores de tumor, alterações imunes, angiogênese e displasia, facilitando a transformação maligna e metástase (Yuzhalin, 2011).

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina que conecta o sistema imune inato e adaptativo e coordena a inflamação tecidual local por meio da indução da liberação de uma série de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, importantes para o recrutamento e ativação de neutrófilos (Arisawa et al, 2007). Ela é sintetizada por células T ativas e alguns estudos revelaram que IL-17 pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do câncer gástrico (Yuzhalin, 2011).

Variações nos genes das diferentes interleucinas e seus receptores têm sido investigadas como potenciais modificadoras da resposta inflamatória, desregulando as cascatas de sinalização induzidas pelas citocinas e induzindo a carcionogênese. O polimorfismo 7488A>G em *IL17F* (rs763780) acarreta em uma alteração funcional, trocando uma histidina (His) por uma arginina (Arg) no aminoácido 161 (Arisawa et al, 2007) e já foi associado anteriormente ao risco aumentado para o câncer gástrico, além de outras características clinicopatológicas, incluindo localização do tumor, subtipo histológico de Lauren, diferenciação tumoral, estadiamento e idade de acometimento (Wu et al, 2010).

1.5.7 LGALS3 (*Lectin, galactoside-binding, soluble, 3*)

O gene humano que codifica para galectina-3 (*LGALS3*) está localizado em 14q21 e é composto por seis éxons. Esse gene codifica para uma proteína que é o único membro do tipo quimera na família das galectinas, contendo um domínio C-terminal para reconhecimento de carboidratos e um domínio N-terminal, que possui importante papel na sua secreção (Hu et al, 2011).

GAL-3 é uma molécula envolvida em diversas funções celulares, cuja atividade biológica varia dependendo da sua localização celular. Ela pode ser encontrada no núcleo, citoplasma, superfície celular, além de também ser secretada na matriz extracelular e eventualmente na circulação (Song et al, 2014). Ela possui flexibilidade para atuar como regulador específico de muitos sistemas biológicos, incluindo processos inflamatórios. O papel da regulação da inflamação pela GAL-3 vem sendo bastante investigado, mostrando sua atuação em vários estágios, desde a inflamação aguda até a inflamação crônica (Henderson, Sethi, 2009). GAL-3 é expressa por várias células do sistema imune e seus níveis de expressão parecem ser dependentes da diferenciação e ativação celular (Liu, 2005).

Em um trabalho prévio publicado por nosso grupo realizado em modelo murino, foi demonstrado que GAL-3 influencia no padrão de infiltração de macrófagos na massa tumoral e tem um grande impacto na sinalização celular de VEGF e TGF β -1. Esses fatores, liberados pelas células tumorais ou por macrófagos, podem ser decisivos para o desenvolvimento de uma neoplasia, tanto na fase de iniciação, promoção e de progressão (Machado et al, 2014). Além desse, outros estudos têm sido conduzidos por nosso grupo, visando compreender o papel de GAL-3 no câncer e na modulação do sistema imune, verificando o padrão de recrutamento e polarização de macrófagos nesse microambiente (dados não publicados).

Vários estudos têm fornecido evidências relevantes sobre o papel de GAL-3 no câncer, atuando sobre o desenvolvimento, progressão, invasão e metástase. A modificação de sua expressão e localização, bem como a presença de variações genéticas de GAL-3 já foram descritas em diversos tipos de neoplasias, porém os mecanismos moleculares parecem ser específicos para cada tipo de câncer (Song et al, 2014).

O silenciamento da expressão de GAL-3 com siRNA (*small interference RNA*) em linhagens de câncer gástrico levou à modulação do perfil de expressão global, com aumento da expressão de vários genes pró-apoptóticos e diminuição de genes de progressão do ciclo celular, demonstrando o possível envolvimento de GAL-3 na resistência à quimioterapia, progressão e malignidade nesse tipo de câncer (Cheong et al, 2010).

Assim como observado em diferentes tipos tumorais, ainda não existe concordância sobre o papel de GAL-3 no câncer gástrico, sendo que os trabalhos são contraditórios no que diz respeito à expressão de GAL-3 no tecido tumoral, tendo sido observado aumento (Baldus et al, 2000; Miyazaki et al, 2002) e também diminuição da expressão da proteína (Okada et al, 2006) em diferentes trabalhos. Em estudo realizado por nosso grupo, GAL-3 apresentou diminuição de expressão em 50% dos tumores gástricos avaliados quando comparados à mucosa gástrica adjacente normal e essa redução foi associada à presença de metástase à distância. Como GAL-3 participa de interações célula-célula e célula-matriz extracelular, foi sugerido que uma menor interação entre as células tumorais poderia facilitar a sua disseminação (Leal et al, 2014).

Nosso estudo contemplará a investigação do polimorfismo rs4644, que acarreta em uma troca de prolina (Pro) por His na posição 191 (+191A>C) do gene *LGALS3*. Foi observado que a forma de GAL-3 que contém His (alelo A) é clivada pelas metaloproteases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), enquanto que a forma da proteína com Pro (alelo C) é resistente à clivagem (Nangia-Makker et al, 2007). Além disso, a forma resistente à clivagem apresentou crescimento de tumor e angiogênese reduzidos em comparação com a GAL-3 que sofre clivagem (Nangia-Makker et al, 2007).

Um estudo funcional em linhagem de câncer de mama demonstrou a importância da clivagem da GAL-3 decorrente da presença do alelo His para a aquisição de um fenótipo mais invasivo, comprovando que algumas proteínas parecem ter papel dual ou até mesmo oposto após clivagem proteolítica (Nangia-Makker et al, 2010). Esse estudo forneceu evidências diretas de que parte das funções reguladas pela GAL-3 durante a progressão do câncer é dependente dessa clivagem. GAL-3 com presença do sítio de clivagem (His) apresentou maior quimiotaxia, quimioinvasão, agregação heterotípica, interação celular epitélio-mesênquima e angiogênese em relação à forma não clivada (Nangia-Makker et al, 2010).

Além disso, foi observada uma importante contribuição desse polimorfismo para a progressão tumoral em linhagem de câncer gástrico humano com superexpressão do alelo A (His). Foi observada que essa forma clivada e mais ativa de GAL-3 proliferou mais e apresentou maior resistência a citotoxicidade induzida por cisplatina e 5-fluoracil. Além disso, houve um maior acúmulo nuclear da mesma, que foi concomitante a um acúmulo nuclear de β -catenina, tendo sido descrito anteriormente a importância da interação entre essas proteínas para a progressão tumoral (Kim et al, 2011).

Todas essas evidências levantadas em relação às alterações funcionais decorrentes da presença desse polimorfismo nos motivaram a selecioná-lo para o estudo.

1.5.8 PHB (*Prohibitin*)

Como o próprio nome sugere, a PHB foi descrita inicialmente com papel na inibição da progressão do ciclo celular. Ela pode ser encontrada na membrana plasmática, no citoplasma, no núcleo, mas sua localização preferencial é na mitocôndria, atuando como uma chaperona envolvida na estabilização das proteínas. As suas diferentes localizações subcelulares influenciam nas suas múltiplas funções dentro da célula e hoje se sabe que ela participa de inúmeros processos celulares, incluindo a regulação da proliferação celular, apoptose e transcrição gênica (Theiss, Sitaraman, 2011).

Foi demonstrado que a atividade antiproliferativa do transcrito de *PHB* estava localizado na região 3'-UTR (Jupe et al, 1996) e, dessa forma, alterações nessa região poderiam levar à perda da função dessa molécula. Dentre os polimorfismos mapeados nessa região, rs6917 ocasiona uma troca de C por T e inicialmente foi associado ao risco aumentado para o câncer de mama (Jupe et al, 2001). Em seguida, estudos funcionais demonstraram que o transcrito contendo o alelo C pareceu exercer uma atividade supressora tumoral, apresentando inibição do crescimento celular e da formação de colônias em linhagens de mama, além de diminuição do crescimento de tumor xenográfico em camundongos *nude* (Manjeshwar et al, 2003), indicando que a região 3'-UTR possa ter um papel funcional regulatório.

Um estudo caso-controle prévio, publicado por nosso grupo demonstrou que o alelo T desse polimorfismo parece desempenhar um papel importante também no desenvolvimento do melanoma, conferindo maior risco quando estratificado para presença de fatores específicos de risco do hospedeiro (Francisco et al, 2013).

PHB também parece ter papel crucial na modulação de processos inflamatórios, protegendo as células do estresse oxidativo associado à inflamação (Theiss, Sitaraman, 2011). Além disso, animais com deficiência parcial de PHB apresentaram progressão dos danos causados no fígado como resultado de uma maior ativação de células inflamatórias, concomitante com uma superprodução de mediadores pró-inflamatórios (Sanchez-Quiles et al, 2012).

Porém, o papel de PHB no câncer permanece controverso, uma vez que sua expressão aparece aumentada em diversos tipos tumorais e dependendo do tipo de tecido e da sua localização intracelular, ela parece ter papel anti ou pró-tumoral (Theiss, Sitaraman, 2011). Da mesma forma, no câncer gástrico sua função ainda é inconclusiva, aparecendo com níveis aumentados em alguns trabalhos (Kang et al, 2008), porém diminuídos em outros (Jang et al, 2004).

Neste sentido, realizamos um estudo recente em nosso grupo buscando compreender o papel de PHB e também desse polimorfismo localizado na região 3'-UTR no câncer gástrico (Leal et al, 2014). De maneira muito interessante observamos que a presença do alelo T foi associada a menores níveis do transcrito e, por sua vez, a expressão diminuída de PHB foi associada a uma menor invasão, ausência de metástase linfonodal e estágios mais precoces da doença (Leal et al, 2014). Esses resultados prévios indicaram um possível papel funcional desse polimorfismo no câncer gástrico e nos motivaram a investigar a sua participação na suscetibilidade e progressão da doença em uma amostra independente da população brasileira.

1.5.9 *TP53 (Tumor protein p53)*

O gene *TP53* está localizado em 17p13 e codifica uma fosfoproteína que atua como potencial fator de transcrição com papel chave na manutenção da estabilidade genética (Bellini et al, 2012). Quando ativado frente a um estresse, desencadeia uma resposta celular adequada, incluindo parada no ciclo celular, reparo de DNA ou morte celular programada (apoptose), prevenindo a propagação de células danificadas (Bellini

et al, 2012). A proteína p53 também está envolvida com outras funções biológicas, como senescência, metabolismo de DNA, angiogênese, diferenciação celular e resposta imune (Suzuki, Matsubara, 2011).

A maior parte dos tumores em humanos apresenta inativação da via de p53, devido a alterações genéticas com perda de função, promovendo o acúmulo de danos ao DNA e levando ao fenótipo do câncer (Bellini et al, 2012). Além das mutações, polimorfismos genéticos descritos em *TP53* também podem resultar em diferentes conformações proteicas. Dentre eles, um polimorfismo localizado no códon 72 do éxon 4 (rs1042522), que acarreta em uma substituição de Arg por Pro, tem sido associado a vários tipos de câncer (Liu et al, 2012; Qiao, Hu, 2013; Yang et al, 2013; Zhao et al, 2013).

Alguns estudos buscaram compreender as alterações nas atividades bioquímicas e biológicas de p53 causadas por esse polimorfismo, uma vez que ele acarreta em uma alteração na estrutura primária da proteína, avaliada inicialmente por uma mobilidade eletroforética distinta (Matlashewski et al, 1987). Embora tenha sido observado que a proteína com a variante Pro interaja mais eficientemente a fatores da maquinaria de transcrição, sendo um ativador transcricional mais ativo (Thomas et al, 1999), a variante Arg é quem possui melhor habilidade em suprimir a transformação de células primárias (Thomas et al, 1999) e de induzir a apoptose (Dumont et al, 2003; Pim, Banks, 2004). Um dos mecanismos associado à maior eficiência de indução a apoptose da variante Arg, demonstrados por Dumont et al (2003), foi a maior eficiência de translocação para a mitocôndria (Dumont et al, 2003).

Várias metanálises buscaram investigar a associação desse polimorfismo com o risco para o câncer gástrico e/ou características clinicopatológicas (Zhou et al, 2007; Liu et al, 2012), porém os resultados ainda são inconclusivos na literatura. Uma metanálise realizada por nosso grupo identificou associação entre esse polimorfismo e maior suscetibilidade ao câncer gástrico do tipo intestinal em populações asiáticas e também em câncer gástrico do tipo não-cárdia (Francisco et al, 2011).

Além do polimorfismo mencionado acima, nosso estudo também investigou uma mutação germinativa (rs121912664) que ocasiona a troca do aminoácido Arg por His no códon 337 (éxon 10) desse gene, descrita inicialmente em pacientes com carcinoma adrenocortical pediátrico no Sul do Brasil (Ribeiro et al, 2001). Essa mutação tem sido associada a diversos tipos de câncer e tem sido mais estudada na região Sul do país, em

que aparece com maior frequência (Assumpcao et al, 2008; Palmero et al, 2008; Borges, Ayres, 2015; Achatz, Zambetti, 2016), provavelmente devido a seu efeito fundador (Pinto et al, 2004; Garritano et al, 2010).

Estudos bioquímicos mostraram que a proteína p53 mutante mantém parcialmente a habilidade de suprimir o crescimento celular sob condições fisiológicas, mas produz tetrâmeros instáveis e alterações funcionais de maneira pH-dependente (DiGiammarino et al, 2002). Além disso, um estudo observou maior dano oxidativo em portadores da mutação, podendo ser efeito de uma desregulação bioenergética e/ou ao aumento do estresse inflamatório resultantes da perda de função de p53 (Macedo et al, 2012).

1.5.10 Haplótipos

Um determinado SNP pode aparecer “ligado” a outros sítios polimórficos localizados próximos fisicamente ao longo de um mesmo cromossomo, formando conjuntos de alelos definidos como haplótipos. Os alelos que compõem esses blocos de haplótipos encontram-se em alto desequilíbrio de ligação e são herdados em conjunto, existindo pouca diversidade entre eles, a menos que um evento de recombinação interrompa essa ligação. O desequilíbrio de ligação tem auxiliado muito nos estudos de associação, de modo que não é necessário genotipar todos os SNPs que compõem um mesmo bloco haplotípico. Se os alelos de dois SNPs estiverem em desequilíbrio de ligação, a identificação de um sempre revelará o outro (Schneider et al, 2008). Neste sentido, o Projeto HapMap surgiu com o objetivo de identificar blocos de haplótipos em indivíduos representativos para diferentes etnias (HapMap Consortium, 2005).

Os genes *TNFB*, *TNFA*, *HSPA1L* e *HSPA1B* estão localizados na região do MHC classe III no cromossomo 6 e apresentam envolvimento em processos imunológicos e inflamatórios (Partida-Rodriguez et al, 2010). Outros dois genes, *VEGFA* e *IL17F*, também selecionados em nosso estudo, estão localizados no mesmo braço cromossômico dos genes citados acima. Desta forma, é possível descrever se os polimorfismos dos genes *TNFB*, *TNFA*, *HSPA1L*, *HSPA1B*, *VEGFA* e *IL17F* encontram-se em desequilíbrio de ligação e são capazes de formar blocos de haplótipos na amostra da população brasileira desse estudo. A Figura 5 ilustra a organização dos polimorfismos desses genes ao longo do cromossomo 6.

Além disso, o gene *COX-2*, localizado no cromossomo 1, também teve dois polimorfismos selecionados para o nosso estudo, para os quais também foi possível investigar o desequilíbrio de ligação e a formação de haplótipos.

As análises convencionais realizadas para verificar a associação de SNPs individuais a diferentes fenótipos podem ser também realizadas utilizando-se os blocos de haplótipos. Portanto, as mesmas análises de associação realizadas para cada um dos polimorfismos individualmente foram também realizadas com os blocos de haplótipos formados.

Figura 5. Ilustração dos genes que se localizam no cromossomo 6 e foram selecionados para as análises de haplótipos; MHC: complexo principal de histocompatibilidade

JUSTIFICATIVA

O câncer gástrico é o quinto tipo mais frequente de tumor e a terceira maior causa de morte por câncer no mundo. No Brasil, ele é o quarto tipo mais prevalente em homens e o quinto em mulheres. Sua etiologia multifatorial e complexidade molecular, incluindo infecção por *H. pylori*, fatores ambientais e genéticos ainda impõem desafios na descoberta de fatores de risco envolvidos no desenvolvimento e progressão dessa doença.

A busca por marcadores moleculares capazes de prever a suscetibilidade para a doença é de extrema importância, bem como marcadores de progressão capazes de refletir a evolução e o comportamento clínico ou biológico do tumor que possam ser utilizados de forma complementar aos métodos convencionais de diagnóstico, estadiamento e prognóstico já utilizados para o câncer de estômago.

Evidências na literatura mostram que a inflamação parece ser um componente crítico para o desenvolvimento tumoral e, paralelamente a isso, dados prévios do nosso grupo demonstraram uma diminuição da expressão de genes de vias de resposta inflamatória e imunológica em pacientes com pior prognóstico no câncer gástrico, evidenciando que uma desregulação/desbalanço na coordenação das expressões de genes nessas vias de relevância parece comprometer a progressão da doença.

Esses achados nos motivaram a investigar variações em genes relacionados à resposta inflamatória que pudessem fornecer evidências sobre mecanismos que expliquem as diferenças interindividuais na suscetibilidade, progressão e prognóstico do câncer de estômago, bem como auxiliar no melhor entendimento dos aspectos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese, da patogênese da doença e até mesmo identificar subgrupos que apresentem maior risco para metástase e/ou recidiva, direcionar a terapia e conduzir novos estudos acerca da função biológica desses polimorfismos e seus respectivos genes.

Além disso, por se tratar de vias etiológicas e patológicas distintas, embora os diferentes subtipos histológicos possivelmente compartilhem vias moleculares associadas à inflamação em comum, provavelmente também possuam outros mecanismos de regulação específicos associados à iniciação, progressão e prognóstico do câncer gástrico. Neste sentido, buscamos investigar as variantes genéticas escolhidas

em nosso estudo considerando a amostra total de casos com câncer gástrico, mas também estratificando para os diferentes subtipos histológicos. Optamos por focar e apresentar os resultados somente para o subtipo histológico difuso por ser descrito como de pior prognóstico, com maior desmoplasia e inflamação associada e por possuir o maior número amostral dentro da nossa casuística de pacientes com câncer gástrico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo geral avaliar a associação entre polimorfismos em genes relacionados à resposta inflamatória/imune (*COX-2*, *OGG1*, *TNFB*, *TNFA*, *HSPA1L*, *HSPA1B*, *VEGFA*, *IL17F*, *LGALS3*, *PHB*, *TP53*) e a suscetibilidade, progressão e prognóstico do câncer gástrico em uma amostra da população brasileira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descrever as frequências genótípicas e alélicas dos quinze polimorfismos selecionados nessa amostra da população brasileira, além da mutação p.R337H do gene *TP53*;

- Comparar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos selecionados entre pacientes com câncer gástrico e indivíduos controles (estudo caso-controle), buscando marcadores genéticos de **risco** para o desenvolvimento do câncer gástrico;

- Descrever as características anatomopatológicas nessa amostra de pacientes com câncer gástrico e verificar a associação entre elas e os polimorfismos selecionados, buscando marcadores genéticos de **progressão** ou agressividade da doença;

- Construir as curvas de sobrevida global e livre de doença para esses pacientes com câncer gástrico e verificar quais variáveis anatomopatológicas foram capazes de prever um pior prognóstico da doença nessa amostra;

- Verificar se as curvas de sobrevida global e livre de doença diferem entre os genótipos/alelos dos polimorfismos selecionados nessa amostra de pacientes com câncer gástrico, buscando marcadores genéticos de **prognóstico** da doença;

- Estratificar a amostra somente para os casos diagnosticados com subtipo histológico difuso e avaliar se existem marcadores de suscetibilidade, progressão e prognóstico específicos para esse subtipo histológico;

- Verificar o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos localizados nos mesmos *loci* cromossômicos e verificar a associação dos haplótipos formados com o risco e a progressão do câncer gástrico;

- Realizar análises de predição *in silico* para verificar se as variantes genéticas que levam a troca de aminoácido possuem efeito funcional sobre a proteína codificada;
- Construir uma rede biológica complexa incluindo os genes analisados nesse estudo, buscando avaliá-los de um ponto de vista integrativo e sistêmico.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Casuística geral (controles e casos com câncer gástrico)

Esse estudo é parte de um projeto colaborativo multicêntrico conhecido como Projeto Genoma Clínico do Câncer (*Clinical Genome of Cancer Project - CGCP*) realizado no Estado de São Paulo, que inicialmente incluiu a investigação de nove diferentes tipos de tumores, coordenados por diferentes grupos. Embora cada grupo clínico fosse guiado por perguntas específicas, três principais desenhos de estudos epidemiológicos foram desenhados: a) estudos transversais para análise de expressão gênica; b) caso-controle para identificação de fatores de risco etiológicos; c) seguimento para avaliação de fatores prognósticos. Dados sobre a logística utilizada para o recrutamento dos controles e dos pacientes com os tipos específicos tumorais, estratégias utilizadas, avaliação da qualidade dos dados obtidos e outras informações mais detalhadas podem ser acessados em um trabalho prévio, publicado na *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* em 2006 (Wunsch-Filho et al, 2006).

Em nosso estudo inicial utilizamos um desenho experimental do tipo caso-controle a fim de avaliar polimorfismos em genes relacionados à resposta inflamatória como fatores de risco para o câncer gástrico. Os indivíduos para os grupos de controles e casos com câncer gástrico foram recrutados concomitantemente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), São Paulo-SP, Brasil, no período entre junho/2001 e outubro/2006. O coordenador de cada subprojeto buscou acompanhar e garantir um balanço entre casos e controles durante todo o período do estudo, de maneira a guiar o recrutamento de controles, obedecendo a um pareamento por gênero e idade.

Os controles utilizados nesse estudo compreenderam 262 indivíduos sem câncer gástrico ou outros tipos de câncer no momento da coleta da amostra. Nosso estudo utilizou uma pequena amostra do grupo de indivíduos controles coletado para uso comum dos estudos oriundos do Projeto do Genoma Clínico do Câncer. Como a ideia inicial seria de que os indivíduos controles coletados para um tipo específico de tumor pudesse ser incluído como controle para os demais grupos, esses indivíduos foram criteriosamente selecionados, obedecendo a uma série de critérios de exclusão em comum estabelecidos para todos os tipos de tumores incluídos nesse grande projeto:

ausência de qualquer tipo de câncer; doenças relacionadas ao uso de álcool e tabaco; doenças ocupacionais; doenças crônicas não-neoplásicas de cavidade oral, faringe, laringe e trato digestivo; imunodeficiências; distúrbios neurológicos; doenças inflamatórias; histórico familiar de câncer; incapacidade de responder aos questionários.

Os casos compreenderam 178 pacientes que receberam o diagnóstico de adenocarcinoma gástrico e foram submetidos à ressecção cirúrgica, confirmados histologicamente e sem tratamento prévio. Foram utilizados como critérios de exclusão: pacientes que tivessem classificação histológica do tipo neuroendócrino; com histórico de cirurgia gástrica ou retirada prévia de tumor gástrico (coto esofágico/gástrico); com qualquer forma de terapia neoadjuvante (previamente à ressecção cirúrgica), incluindo quimio e radioterapia; doença irressecável; lesões associadas a doenças infecciosas ou inflamatórias; não consentimento pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); pacientes sem material biológico para extração de DNA ou com amostra de DNA de qualidade insatisfatória para a genotipagem. Inicialmente foram incluídos 245 casos, porém, após reanálise minuciosa dos laudos anatomopatológicos e exclusão de casos que não preencheram os critérios acima mencionados, o número amostral final de 178 pacientes foi atingido.

Ambos os grupos foram entrevistados e responderam um questionário geral padronizado que investigou indicadores sócio-demográficos e hábitos de vida, incluindo gênero, idade, etnia e grau de instrução, histórico detalhado de câncer na família, histórico de exposição a fatores de risco ambientais e de estilo de vida associados ao câncer (como etilismo, tabagismo, experiência ocupacional).

O histórico de tabagismo foi considerado a partir da utilização de cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, por pelo menos um ano. Essa variável foi categorizada em “nunca fumou”, “somente no passado” e “sim, ainda fuma”, sendo que indivíduos que pararam de fumar há menos de 12 meses foram considerados como fumantes.

O histórico de etilismo foi considerado a partir da ingestão de bebidas alcoólicas por pelo menos uma vez por mês. Essa variável foi categorizada como “nunca”, “somente no passado” e “sim, ainda bebe”. Indivíduos que pararam de beber há menos de 12 meses foram incluídos no grupo dos que ainda bebem.

Outros três formulários específicos (dados clínico, anatomopatológicos e de seguimento) foram preenchidos especificamente para o grupo de casos e estão disponíveis nos.

A verificação da adequação do tamanho amostral para esse estudo está descrita nas Seções de Análise Estatística, Resultados e Discussão.

3.2 Aspectos Éticos

Após receberem informações detalhadas sobre a natureza e os objetivos do estudo, todos os participantes assinaram um TCLE. Os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinque e o protocolo de pesquisa foi aprovado pelo CONEP (Brasília, Brasil) e pelo Comitê de Ética Local (CEP/FMUSP) sob o número 222/01, com atualização aprovada em 04/09/2014 (Anexo 1).

3.3 Características anatomopatológicas (casos com câncer gástrico)

Na segunda parte desse estudo, em que foi avaliada a associação entre os polimorfismos genéticos e as características anatomopatológicas, todos os pacientes diagnosticados com câncer gástrico que participaram do estudo caso-controle inicial tiveram seus laudos anatomopatológicos recuperados pelos prontuários clínicos eletrônicos do Hospital das Clínicas (HCMED) para revisão de todas as variáveis selecionadas.

Todos os laudos foram minuciosamente revisados pela aluna, que contou com auxílio de três médicos cirurgiões do aparelho digestivo: Dr Carlos Eduardo Jacob (Médico do HC-FMUSP), Dr Ulysses Ribeiro Júnior (Professor Associado de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP e coordenador do Centro Cirúrgico do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira / ICESP) e Dr Marcus Fernando Kodama Pertille Ramos (Médico Assistente do Serviço de Cirurgia Digestiva Oncológica do ICESP).

As seguintes características anatomopatológicas foram reavaliadas:

- Idade de acometimento ao diagnóstico
- Tamanho do tumor
- Subtipo Histológico (Classificação de Lauren)

- Profundidade de invasão (pT)
- Invasão perineural
- Invasão vascular linfática
- Invasão vascular sanguínea (venosa)
- Infiltração inflamatória
- Desmoplasia
- Invasão para outros órgãos (pT4b)
- Comprometimento linfonodal (pN)
- Metástase linfonodal
- Metástase à distância (pM)
- Estadiamento (baseado na classificação pTNM)

Informações sobre o local de acometimento do tumor não foram relatadas de forma homogênea nos laudos anatomopatológicos e, portanto, essa variável foi excluída das análises nesse estudo.

Além disso, tentamos recuperar o maior número de casos possíveis que possuíam informações sobre a infecção por *H. pylori* nos prontuários disponíveis no sistema HCMED, em laudos anatomopatológicos das biópsias realizadas previamente à cirurgia de ressecção e dados sorológicos. Porém, embora saibamos que essa variável seja um importante fator etiológico a ser considerado na carcinogênese gástrica, optamos por excluí-la do estudo, visto que tanto os indivíduos controles quanto a maioria dos casos não possuíam essa informação disponível. Embora tenhamos acesso aos blocos de parafina para a maioria dos pacientes, optamos por não investigar a presença de *H. pylori* nas amostras de tumor parafinadas, visto que não podemos afirmar que casos negativos sejam realmente negativos-verdadeiros e não possuíam infecção prévia pela bactéria.

As amostras, que inicialmente foram classificadas histologicamente de acordo com critérios propostos pelo Prof Dr Kiyoshi Iriya (classificação de IRIYA), a convite da Sociedade Brasileira de Patologia, foram reclassificadas para o subtipo histológico de Lauren, aceito internacionalmente (Lauren, 1965). Além disso, o estadiamento, que estava baseado no TNM proposto em 1998, foi atualizado para a 7ª edição estabelecida em 2010 pela UICC e AJCC (AJCC, 2010).

Não foram coletadas informações relacionadas ao tratamento desses pacientes, pois inicialmente não era enfoque do estudo buscar marcadores de predição à resposta farmacológica.

3.4 Sobrevida global e livre de doença (casos com câncer gástrico)

Para essa etapa, foram recuperadas todas as informações de acompanhamento dos pacientes da data de diagnóstico até o último seguimento no complexo HC-FMUSP, definida em março de 2016 para esse estudo. Esse não pode ser considerado verdadeiramente como um estudo de seguimento, pois os dados que permitiram realizar as análises de sobrevida global e livre de doença foram recuperados de forma retrospectiva (mais detalhes na Seção de Discussão).

Esses pacientes foram acompanhados pela equipe de Cirurgia do Estômago do Hospital das Clínicas durante todo o período posterior ao diagnóstico, realizando consultas periódicas e exames de acompanhamento. Além das informações contidas no sistema HCMED, coletamos a maior quantidade de informações possíveis para seguimento, disponíveis em outros prontuários médico-hospitalares eletrônicos e físicos (demográficas, epidemiológicas, clínicas, laudos anatomopatológicos, consultas em diferentes especialidades médicas, exames de sangue, endoscopias de rotina, entradas pelo pronto-atendimento médico, dosagens de níveis séricos e outros exames de imagem disponíveis). Para isso contamos com os prontuários digitalizados do Instituto de Radiologia (INRAD) (Sistema Laserfish), o Sistema Integrado de Gestão Hospitalar (SIGH), prontuários eletrônicos do ICESP (Sistema Tasy), consulta de declarações de óbitos em bancos públicos de óbitos da Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE).

Foram levantadas informações referentes à data de último retorno (considerada como data do último seguimento); status na data do último seguimento (vivo ou morto, com ou sem doença); detecção de recidiva tumoral (data e local da recidiva, somente foram consideradas recidivas para os casos que possuíam exame de imagem ou registro médico confirmando o achado), casos com óbito pós-operatório (considerados até 30 dias após a cirurgia), data e causa de óbitos gerais (se óbito pela doença ou não). Foi considerada a última data de retorno para pacientes com perda de seguimento (as causas

de perda de seguimento incluíram mudança de cidade, não comparecimento em consultas pré-agendadas, mudança para outro hospital).

Desta forma, a análise de sobrevida global considerou como desfecho o óbito geral (considerando-se todas as causas de óbito), enquanto a sobrevida livre de doença considerou como desfecho a presença de recidiva ou óbito específico pela doença. O tempo total para sobrevida global, em meses, foi calculado desde a data do diagnóstico até data de óbito do paciente (considerando-se quaisquer causas de óbito) e o tempo para sobrevida livre de doença foi considerado a partir da data de diagnóstico até a data de detecção de recidiva (local, regional ou à distância) ou data de óbito causado especificamente pela doença.

3.5 Coleta do sangue periférico e obtenção do DNA genômico

As amostras de sangue periférico dos pacientes e dos controles foram coletadas durante as consultas de acompanhamento ambulatorial, após a assinatura do TCLE. O material foi coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA, foi processado por centrifugação refrigerada para obtenção do *pellet* leucocitário contendo as células nucleadas e foi armazenado a -20°C para posterior extração de DNA.

O DNA genômico foi extraído utilizando-se o *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, EUA) de acordo com instruções do fabricante. A concentração de DNA (em ng/μL) foi determinada utilizando os valores de Densidade Ótica absorvidos a 260nm em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, EUA), utilizando 1μL de amostra. Foram considerados com pureza aceitável, amostras com razão $A_{260/280}$ entre 1,8-2,1. A integridade das amostras foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com intercalante de dupla fita brometo de etídeo (Invitrogen/EUA) ou GelRed™ (Uniscience/EUA) e visualizado em transiluminador ultravioleta.

3.6 Polimorfismos selecionados para o estudo

A Tabela 2 apresenta as informações completas sobre os onze genes e os respectivos polimorfismos selecionados para nosso estudo, incluindo nomenclaturas padronizadas ou outros nomes pelos quais são descritos na literatura; a descrição do alelo considerado polimórfico; a exata coordenada cromossômica (necessária para a

análise de haplótipos), disponível nos banco de dados públicos do UCSC *Genome Browser* GRCh37/hg19 (<https://genome.ucsc.edu/>) e no dbSNP do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>); a localização gênica; e se acarretam em troca de aminoácido na proteína codificada pelo gene em questão. Além dos quinze polimorfismos escolhidos para análise, também investigamos uma mutação descrita no códon 337 de *TP53* (Tabela 2).

Os polimorfismos analisados nesse estudo foram selecionados após uma busca criteriosa na literatura. Foram escolhidos variantes já validadas e bem documentadas, com descrição de potencial alteração funcional em genes relacionados a processos imunológicos e resposta inflamatória. Também nos baseamos em dados de associação prévia com câncer gástrico, com outros tipos de câncer ou com características anatomopatológicas, além de selecionar SNPs com frequência do alelo polimórfico descrita pelo Projeto 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org/>) maior do que 5% (Tabela 6).

Tabela 2. Descrição dos polimorfismos escolhidos para nosso estudo, incluindo sua nomenclatura padronizada, outros nomes descritos na literatura, o alelo descrito como polimórfico, a exata coordenada cromossômica e o tipo de alteração dependendo da localização gênica

Gene	Nomenclatura padronizada	Outros nomes	Alelo polimórfico	Coordenada cromossômica ^a	Tipo
COX-2/PTGS2	rs689466	-1195G>A	G	chr1:186650751	<i>upstream</i> (promotor)
	rs5275	+8437T>C	C	chr1:186643058	3'-UTR
OGG1	rs1052133	C1245G / Ser326Cis	G	chr3:9798773	<i>missense</i> (Ser→Cis)
TNFB/LTA	rs909253	+252G>A	G	chr6:31540313	intrônica (1º intron)
TNFA	rs1800629	-308G>A	A	chr6:31543031	<i>upstream</i> (promotor)
HSPA1L/HSP70-HOM	rs2227956	+2437T>C / Thr493Met	C	chr6:31778272	<i>missense</i> (Met→Thr)
HSPA1B/HSP70-2	rs1061581	+1267A>G	A	chr6:31784586	Sinônima (Gln→Gln)
VEGFA	rs699947	-2578C>A	A	chr6:43736389	<i>upstream</i> (promotor)
	rs833061	-460T>C / -1498T>C	C	chr6:43737486	<i>upstream</i> (promotor)
	rs2010963	+405G>C / -634G>C	C	chr6:43738350	5'-UTR
	rs3025039	+936C>T	T	chr6:43752536	3'-UTR
IL17F	rs763780	7488A>G / His161Arg	G	chr6:52101739	<i>missense</i> (His→Arg)
LGALS3	rs4644	+191A>C / Pro64His	A	chr14:55604935	<i>missense</i> (Pro→His)
PHB	rs6917	1630C>T	T	chr17:47481543	3'-UTR
TP53	rs1042522	Arg72Pro	C	chr17:7579472	<i>missense</i> (Arg→Pro)
	rs121912664 (mutação) ^b	p.R337H/c.1010G >A/Arg337His	A	chr17:7574017	<i>missense</i> (Arg→His)

^aInformação baseada nos bancos de dados públicos do UCSC *Genome Browser* GRCh37/hg19 ou dbSNP (NCBI); ^bvariação genética descrita como mutação não como polimorfismo; chr: cromossomo; UTR: *untranslated region*

Os tipos de polimorfismos escolhidos em nosso estudo incluíram variantes genéticas localizadas em regiões regulatórias ou codificantes de proteína (éxons). As regiões regulatórias incluíram variantes localizadas *upstream* ao gene (situadas a 5' do gene em questão, na região promotora); nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR, que representam regiões transcritas, porém não traduzidas de um gene e em região intrônica (dentro de um intron, região não codificada do gene). Já as variantes em região codificantes de proteína (éxons) incluíram variações sinônimas ou silenciosas (que não resultam em alteração do aminoácido codificado) e *missenses* ou não sinônimas (que alteram o aminoácido codificado) (Figura 6).

Figura 6. Esquema da estrutura convencional de um gene e a representação da localização gênica das variantes genéticas escolhidas nesse estudo. Foram selecionados polimorfismos em região *upstream* (promotor gênico; representada em vermelho), em 5'-UTR e 3'-UTR (regiões transcritas, mas não traduzidas; representadas em azul), em íntron (região não codificante; representada em preto) e em éxon (região codificante; representada em cinza). Substituições em éxons podem ser sinônimas ou silenciosas (não alteram a sequência do aminoácido da proteína final) ou *missense*/não sinônimas (acarretam em troca de aminoácido); UTR: *untranslated region*

Seis dos polimorfismos avaliados (Tabela 2) possuem substituições de base que ocasionam alteração de aminoácido no seu produto final (*missenses* ou não sinônimas). Para avaliar a possível alteração funcional dessas variantes na proteína, foram utilizados os *softwares* de predição *in silico* Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, disponível no link <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>) e SIFT (disponível em <http://sift.jcvi.org/>). As variantes genéticas são classificadas desde “toleradas/benignas” até “deletérias/potencialmente patogênicas”.

3.7 Genotipagem dos polimorfismos selecionados

3.7.1 *POLIMERASE CHAIN REACTION - RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (PCR-RFLP)*

Para o estudo dos polimorfismos dos genes *OGG1*, *TNFB*, *TNFA*, *HSPA1B*, *HSPA1L*, *IL17F*, *LGALS3* e *TP53* foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (do inglês, *Polimerase Chain Reaction – Restriction Length Polymorphism*). Ela baseia-se na amplificação por PCR convencional de uma sequência que contém o SNP de estudo, flanqueado por pares de *primers* desenhados para a região de interesse, seguida da fragmentação do produto amplificado por uma enzima de restrição que reconhece um sítio específico que contém o polimorfismo estudado.

Maiores informações sobre os polimorfismos de interesse e as sequências dos respectivos genes de interesse (*Homo sapiens*) foram obtidas em bancos de dados públicos como NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), Ensemble (<http://www.ensembl.org/>) e USCS Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>). Os pares de *primers* foram desenhados utilizando os *softwares* Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e/ou Primer Quest (<https://www.idtdna.com/Primerquest>). As características gerais dos *primers* desenhados e a formação de estruturas secundárias (*hairpins*, homodímeros e heterodímeros) foram checadas por meio do *software* Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) e a ausência de homologia com outras sequências do genoma foi confirmada no *software* BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As enzimas de restrição foram escolhidas com a utilização do *software* NEBcutter v2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

Os fragmentos amplificados e posteriormente digeridos com suas respectivas enzimas de restrição (Tabela 3) foram observados em gel de agarose, corados com intercalantes de dupla fita brometo de etídeo (Invitrogen/EUA) ou GelRedTM (Uniscience/EUA) e visualizados em transiluminador ultravioleta.

Tabela 3. Polimorfismos estudados e detalhes de seus pares de *primers*, tamanho dos fragmentos amplificados, enzimas de restrição específicas e tamanho dos fragmentos originados após digestão enzimática

Polimorfismo (Gene)	<i>Primers (Forward e Reverse)</i>	Fragmento amplificado (pb)	Enzima de restrição	Fragmentos após digestão (pb)
rs1052133 (<i>OGGI</i>)	F5'-AGTGGATTCTCATTGCCTTCG-3' R5'-GGTGCTTGGGGAATTTCTTT-3'	251	<i>Fnu4HI</i>	251, 155, 96
rs909253 (<i>TNFB</i>)	F5'-TCTGACTCTCCATCTGTCTCAGTCTC-3' R5'-GAAGAGACGTTTCAGGTGGTGTCTCAT-3'	290	<i>NcoI</i>	290, 262, 55
rs1800629 (<i>TNFA</i>)	F5'-GGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' R5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'	107	<i>NcoI</i>	107, 87, 20
rs2227956 (<i>HSPA1L</i>)	F5'-GGACAAGTCTGAGAAGGTACAG-3' R5'-TAACTTAGATTTCAGGTCTGG-3'	877	<i>NcoI</i>	877, 553, 324
rs1061581 (<i>HSPA1B</i>)	F5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3' R5'-CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC-3'	1146	<i>PstI</i>	1146, 934, 183
rs763780 (<i>IL17F</i>)	F5'-GCACCAAGGCTGCTCTGTTTCTT-3' R5'-GGTAAGGAGTGGCATTCTCTACA-3'	145	<i>NlaIII</i>	145, 86, 59
rs4644 (<i>LGALS3</i>)	F5'-CTCCATGATGCGTTATCTGGGTCTGG-3' R5'-CAGTGGCCCAGCAGGGGCGCCATAGG-3'	324	<i>NcoI</i>	324, 171, 153
rs1042522 (<i>TP53</i>)	F5'-GAAGACCCAGGTCCAGATGA-3' R5'-CTGCCCTGGTAGGTTTTCTG-3'	152	<i>BstUI</i>	152, 102, 50

F: forward; R: reverse; pb: pares de base

A descrição detalhada das padronizações das PCRs e digestões enzimáticas, com as respectivas enzimas de restrição, encontra-se a seguir.

3.7.1.1 Polimorfismo rs1052133 (Gene *OGGI*)

A reação de amplificação do fragmento de 251pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,0 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 µmol/L de cada *primer* em volume final de 25µL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 6µL de produto de PCR foram incubados com 1U da enzima de restrição *Fnu4HI* (5U/µL) (New England Biolabs, EUA) por 16h a 37°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 80°C. Os resultados da PCR e da digestão foram observados em gel de agarose, corado em brometo de etídio/GelRedTM e visualizado em transiluminador ultravioleta.

O alelo G possui um sítio de restrição para a enzima *Fnu4HI*, resultando nos fragmentos de 155pb e 96pb, enquanto que o alelo C não possui esse sítio, permanecendo com o fragmento de 251pb.

3.7.1.2 Polimorfismo rs909253 (Gene *TNFB*)

A reação de amplificação do fragmento de 290pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,0 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 µmol/L de cada *primer* e 1X DMSO em volume final de 25µL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 62°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 6µL de produto de PCR foram incubados com 2U da enzima de restrição *NcoI* (10U/µL) (New England Biolabs, EUA) por 16h a 37°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 80°C. O alelo G possui um sítio de

restrição para a enzima *NcoI*, resultando nos fragmentos de 262pb e 55pb, enquanto que o alelo A não possui esse sítio, permanecendo com o fragmento de 290pb.

3.7.1.3 Polimorfismo rs116610137 (Gene *TNFA*)

A reação de amplificação do fragmento de 107pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,0 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 µmol/L de cada *primer* em volume final de 25µL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 6µL de produto de PCR foram incubados com 2U da enzima de restrição *NcoI* (10U/µL) (New England Biolabs, EUA) por 16h a 37°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 80°C. O alelo G possui um sítio de restrição para a enzima *NcoI*, resultando nos fragmentos de 87pb e 20pb, enquanto que o alelo A não possui este sítio, permanecendo com o fragmento de 107pb.

3.7.1.4 Polimorfismo rs2227956 (Gene *HSPA1L*)

A reação de amplificação do fragmento de 877pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 µmol/L de cada *primer* em volume final de 25µL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 6µL de produto de PCR foram incubados com 2U da enzima de restrição *NcoI* (10U/µL) (New England Biolabs, EUA) por 16h a 37°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 80°C. O alelo T possui um sítio de restrição para a enzima *NcoI*, resultando nos fragmentos de 324pb e 553pb, enquanto que o alelo C não possui esse sítio, permanecendo com o fragmento de 877pb.

3.7.1.5 Polimorfismo rs1061581 (Gene *HSPA1B*)

A reação de amplificação do fragmento de 1146pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,0 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 μmol/L de cada *primer* em volume final de 25μL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 4μL de produto de PCR foram incubados com 7U da enzima de restrição *Pst*I (10U/μL) (Fermentas, EUA) por 16h a 60°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 80°C. O alelo G possui um sítio de restrição para a enzima *Pst*I, resultando nos fragmentos de 934pb e 183pb, enquanto que o alelo A não possui esse sítio, permanecendo com o fragmento de 1146pb.

3.7.1.6 Polimorfismo rs763780 (Gene *IL17F*)

A reação de amplificação do fragmento de 145pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,0 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 μmol/L de cada *primer* em volume final de 25μL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 5μL de produto de PCR foram incubados com 3U da enzima de restrição *Nla*III (10U/μL), suplementada com 0,01μg de soro fetal bovino (New England Biolabs, EUA) por 16h a 37°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 80°C. O alelo A possui um sítio de restrição para a enzima *Nla*III, resultando nos fragmentos de 86pb e 59pb, enquanto que o alelo G não possui esse sítio, permanecendo com o fragmento de 145pb.

3.7.1.7 Polimorfismo rs4644 (Gene *LGALS3*)

A reação de amplificação do fragmento de 324pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 μmol/L de cada *primer* em volume final de 25μL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 57°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 7μL de produto de PCR foram incubados com 2U da enzima de restrição *NcoI* (10U/μL) (New England Biolabs, EUA) por 16h a 37°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 80°C. O alelo A possui um sítio de restrição para a enzima *NcoI*, resultando nos fragmentos de 171pb e 153pb, enquanto que o alelo C não possui esse sítio, permanecendo com o fragmento de 324pb.

3.7.1.8 Polimorfismo rs1042522 (Gene *TP53*)

A reação de amplificação do fragmento de 152pb foi padronizada nas seguintes condições: 50 mmol/L de KCl, 10 mmol/L de TrisHCl (pH= 8,5), 1,0 mmol/L de MgCl₂, 0,4 mmol/L de dNTP, 01 unidade de *Taq DNA polymerase* (Fermentas, EUA) e 0,16 μmol/L de cada *primer* em volume final de 25μL. A mistura passa por desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s, extensão 72°C por 30s, e extensão final a 72°C por 10 min.

Para a digestão enzimática, 6μL de produto de PCR foram incubados com 2U da enzima de restrição *BstUI* (10U/μL) (New England Biolabs, EUA) por 16h a 60°C. Após esse período, a enzima foi inativada por 20 min a 85°C. O alelo G possui um sítio de restrição para a enzima *BstUI*, resultando nos fragmentos de 102pb e 50pb, enquanto que o alelo C não possui esse sítio, permanecendo com o fragmento de 152pb.

3.7.2 PCR em Tempo Real – Ensaios TaqMan[®]

Os polimorfismos dos genes *VEGFA*, *COX-2* e *PHB* e a mutação do gene *TP53* foram genotipados por meio da técnica de PCR em Tempo Real utilizando-se ensaios

TaqMan[®] *SNP Genotyping* (Life Technologies, EUA). Para os genes *VEGFA* e *COX-2* foram utilizados ensaios comercialmente disponíveis e validados (Tabela 4).

Tabela 4. Ensaios *TaqMan* comercialmente disponíveis, utilizados para a detecção dos polimorfismos dos genes *VEGFA* e *COX-2* por PCR em Tempo Real

Ensaio	Sondas fluorescentes [alelo 1 (VIC)/ alelo 2 (FAM)]	Gene	Polimorfismo
C__8311602_10	GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA[A/C]GATCTGGGTGGATAATCAGACTGAC	<i>VEGFA</i>	rs699947
C__1647381_10	GAGTGTGTGCGTGTGGGGTTGAGGG[C/T]GTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGG	<i>VEGFA</i>	rs833061
C__8311614_10	CGCGCGGGCGTGCAGCAGCGAAAG[C/G]GACAGGGGCAAAGTGAGTGACCTGC	<i>VEGFA</i>	rs2010963
C__16198794_10	GCATTCCCGGGCGGGTGACCCAGCA[C/T]GGTCCCTCTTGAATTGGATTGCGCC	<i>VEGFA</i>	rs3025039
C__2517145_20	TTAGATGGAAGGGAGATTTTGACAG[C/T]TGGAATTTTCATCTTTGCTTTTGT	<i>COX-2</i>	rs689466
C__7550203_10	TGTTTTTGTGTTGATGACAGAAAAAT[A/G]ACCAAAAGTACTTTAAAATTTCAAA	<i>COX-2</i>	rs5275

Para o polimorfismo rs6917 do gene *PHB* foi utilizado um ensaio *TaqMan*[®] customizado, com *primers forward* e *reverse* 5'-TTGGTCCCTCTCAGATACCCA-3' e 5'-CCGTGAGAAGGGCAGTCTCT-3', respectivamente. A sonda contendo o alelo selvagem C (5'-CTGCCAAAGACCGTGT-3') foi marcada com fluorocromo FAM, enquanto a sonda contendo o alelo polimórfico T (5'-CTGCCAAAGATTGTGT-3') foi marcada com VIC, sendo o produto final amplificado do tamanho de 131pb.

Para a mutação p.R377H do gene *TP53* também foi utilizado um ensaio *TaqMan*[®] customizado, com *primers forward* e *reverse* 5'-CCTCCTCTGTTGCTGCAGATC-3' e 5'-CCTCATTGAGCTCTCGGAACAT-3', respectivamente. A sonda contendo o alelo G (5'-CGTGAGCGCTTCGAG-3') foi marcada com fluorocromo VIC, enquanto a sonda contendo o alelo polimórfico A (5'-CGTGAGCACTTCGAG-3') foi marcada com FAM, sendo o produto final amplificado do tamanho de 64pb.

Essa metodologia tem como princípio a ação exonuclease da *Taq DNA polimerase*, contendo *primers* que flanqueiam a região estudada e uma sonda para cada alelo, uma marcada com um fluorocromo VIC e uma marcada com um fluorocromo FAM. As sondas possuem um repórter fluorescente 5' e um *quencher* (silenciador) 3', que absorve a fluorescência do repórter. Após a desnaturação, as sondas e, em seguida, os *primers* anelam-se aos seus alvos. Durante o passo de polimerização, a *Taq DNA polimerase* cliva e separa fisicamente a sonda repórter do *quencher*, resultando na liberação do sinal fluorescente, que foi detectado pelo equipamento.

Dessa forma, os resultados são avaliados quanto à presença ou ausência da amplificação de cada alelo. As amostras são então genotipadas e colocadas em um gráfico que as separa em *clusters* dos diferentes genótipos (Figura 7).

Figura 7. Exemplo de representação dos resultados obtidos pela metodologia de genotipagem por PCR em Tempo Real utilizando-se ensaios TaqMan®. **a)** Amplificação das amostras utilizando sondas para um alelo com fluorocromo VIC (em verde) e para o outro alelo com fluorocromo FAM (em azul) em diferentes amostras. A fluorescência passiva utilizada foi o ROX (em vermelho); **b)** Gráfico mostrando os *clusters* de genótipos: amostras de indivíduos homozigotos para o alelo C em vermelho (genótipo CC), heterozigotos em verde (genótipo AC) e homozigotos para o alelo A em azul (genótipo AA)

O volume final da reação foi de 10 μ L, utilizando 5,25 μ L de *TaqMan Universal Master Mix* (Life Technologies, EUA), 0,25 μ L de ensaio contendo sondas e *primers* (40X), 3,5 μ L de água e 1 μ L de DNA com concentração de 10ng/ μ L. Para esses experimentos, foram utilizados os equipamentos de PCR em Tempo Real *StepOne Plus* ou 7500 da Life Technologies (EUA) disponíveis no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO/ICESP) e as condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação a 95°C por 10 min e 40 ciclos de: 15s de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento a 60°C, seguido de uma extensão final de 3 min a 60°C. As reações foram realizadas em duplicadas técnicas, com utilização de controles positivos para cada genótipo e controle negativo, que garantiu ausência de contaminação para a reação.

3.8 Análise Estatística

3.8.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas e os genótipos foram calculados por contagem de alelos e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado por meio de teste de χ^2 , comparando se as frequências genotípicas/alélicas observadas diferiram dos valores esperados de acordo com o EHW. O EHW foi testado na amostra total e separadamente para as amostras de casos e controles, considerando-se como significantes valores de $p < 0,01$.

3.8.2 Modelos Genéticos avaliados

As análises foram realizadas baseando-se em quatro modelos genéticos descritos na literatura para estudos de associação, representados na Figura 8. Considerando-se que o alelo polimórfico é o alelo menos frequente, podemos assumir os seguintes modelos de análise: (1) Modelo por contagem de Genótipos (que nesta tese será mencionado como Modelo de Genótipos, em que comparamos as frequências dos homozigotos para o alelo selvagem, heterozigotos e homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados); (2) Modelo multiplicativo por contagem de Alelos (que nessa tese será mencionado como Modelo de Alelos, em que comparamos as frequências do alelo selvagem e alelo polimórfico entre os grupos estudados); (3) Modelo Dominante (comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem e de heterozigotos + homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados), em que queremos avaliar se o alelo polimórfico possui efeito dominante e somente uma cópia é necessária para manifestação do fenótipo avaliado; e (4) Modelo Recessivo (comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem + heterozigotos e de homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados), em que queremos investigar se o alelo polimórfico é recessivo e são necessárias as duas cópias do alelo para manifestar o fenótipo (Lewis, Knight, 2012).

Figura 8. Representação esquemática dos métodos de análise para estudos de associação com polimorfismos, assumindo-se diferentes modelos genéticos; A: alelo selvagem; a: alelo polimórfico. Modificado de Lewis e Knight, 2012

Todos os testes estatísticos para os polimorfismos individuais foram realizados utilizando-se o pacote estatístico SPSS® 18.0 e a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p < 0,05$.

3.8.3 Associações dos polimorfismos com o câncer gástrico e/ou com as variáveis anatomopatológicas

O teste de Shapiro-Wilk avaliou se as variáveis quantitativas do estudo (Idade e Tamanho de tumor) seguiram a distribuição normal e, como ambas as variáveis não obedeceram a normalidade dos dados, foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis nas análises envolvendo as comparações dessas variáveis.

Para verificar diferenças das variáveis descritivas entre casos e controles, bem como das variáveis anatomopatológicas entre os subtipos histológicos (intestinal e difuso de Lauren), foram utilizados os testes de χ^2 ou Exato de Fisher.

Esses mesmos testes foram utilizados para verificar se houve diferença na distribuição das frequências genotípicas/alélicas entre casos e controles, assim como para verificar associações entre os genótipos/alelos e as características anatomopatológicas. Foram calculados os resíduos ajustados para cada frequência

genotípica/alélica a fim de confirmar aquelas que apresentaram diferenças significativas (foram considerados significantes, os valores de resíduos ajustados maiores que 2,0 e menores que -2,0).

Para calcular o risco dos polimorfismos que foram associados nas análises univariadas, foram estimados valores de *Odds ratio* (OR, razão de chances) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) utilizando a regressão logística binária, ajustada para gênero, idade, tabagismo e etilismo. O genótipo homozigoto selvagem foi considerado como referência nas análises utilizando os Modelos de Genótipo e Dominante, enquanto que a presença do alelo selvagem foi utilizada como referência nos Modelos Recessivo e de Alelos. Valores de $OR > 1$ indicam risco aumentado em apresentar o fenótipo e valores $OR < 1$ indicam proteção em relação ao fenótipo avaliado.

Essas análises foram realizadas para os quatro modelos genéticos propostos no estudo, inicialmente considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178) e, posteriormente, discriminando-se somente os casos com subtipo histológico difuso de Lauren (N=112).

3.8.4 Associações dos haplótipos com o câncer gástrico e com as variáveis anatomopatológicas

Para as análises de haplótipos, obedeceu-se ao pré-requisito de inclusão somente de polimorfismos que estivessem em EHW, sendo que aqueles que não seguiram o EHW foram automaticamente excluídos da análise. O desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos foi avaliado por meio do cálculo do parâmetro D' usando o *software* para análise de haplótipos conhecido como Haploview 4.2 (disponível no [link https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview](https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview)). O cálculo do desequilíbrio de ligação leva em consideração a distância estimada entre os polimorfismos, cujas coordenada cromossômicas foram baseadas em informações contidas no UCSC *Genome Browser* GRCh37/hg19 (<https://genome.ucsc.edu/>) e no dbSNP do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) (Tabela 2), e a probabilidade de os alelos estarem presentes no mesmo haplótipo de acordo com a frequência observada de cada polimorfismo na população estudada. Os polimorfismos foram considerados em desequilíbrio de ligação quando os valores de D' foram $\geq 0,75$ e as frequências dos haplótipos foram calculadas pelo algoritmo EM (*Expectation-Maximization*).

Foi avaliado o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos na amostra total, incluindo casos e controles, para selecionar os haplótipos que foram verificados quanto à associação com câncer gástrico, bem como somente na amostra de casos, para avaliar a associação entre os blocos haplotípicos e as características anatomopatológicas no câncer gástrico.

O teste de χ^2 foi utilizado para comparar a frequência de cada haplótipo entre casos e controles utilizando o *software* Haploview 4.2 e os haplótipos com frequências menores do que 1% foram excluídos da análise. As associações entre os haplótipos e as características anatomopatológicas foram avaliadas utilizando-se o *software* PLINK (*link* disponível em <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). Para as variáveis dependentes quantitativas (idade de acometimento e tamanho de tumor) foram utilizados modelos de regressão linear e para as variáveis dependentes binárias (demais variáveis) foi utilizado o teste de χ^2 .

As análises de haplótipos foram realizadas somente considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178), tanto no estudo caso-controle, quanto na associação com as características anatomopatológicas.

3.8.5 Análise de sobrevida global e livre de doença

Os dados de seguimento dos pacientes foram coletados até março/2016 e as taxas de sobrevida global e livre de doença foram estimadas utilizando-se o método de Kaplan-Meier e as curvas estratificadas por genótipos/alelos foram comparadas por meio do teste log rank. A sobrevida global foi considerada desde a data de diagnóstico patológico até a data de óbito por qualquer causa ou data do último seguimento. A sobrevida livre de doença foi definida considerando-se a data de diagnóstico até data de recorrência da doença (recidiva local, regional ou à distância), óbito específico pela doença ou finalização do seguimento. Em ambos os casos, pacientes com perda de seguimento ou que ainda estavam vivos no último seguimento foram considerados como eventos censurados nas análises. Além disso, foram construídos modelos de regressão de Cox, calculando-se os valores de *Hazard Ratio* (HR) e IC 95% para cada genótipo/alelo, estimando seus efeitos na sobrevida, com ajuste para as variáveis anatomopatológicas significativamente associadas à sobrevida global e livre de doença nas análises univariadas.

Essas análises foram realizadas para os quatro modelos genéticos propostos no estudo, inicialmente considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178) e, posteriormente, estratificando somente para os casos com subtipo histológico difuso de Lauren (N=112).

3.8.6 Verificação do tamanho amostral e/ou poder estatístico

Os valores de poder estatístico ($1-\beta$) ou tamanho amostral estimados foram calculados *a posteriori*, ou seja, após obtenção dos resultados. Esses cálculos foram realizados a fim de verificar se o número amostral ou valores de poder estatístico obtidos foram adequados para os testes aplicados nas etapas dos diferentes desenhos de estudo desse trabalho (caso-controle, associação com variáveis anatomopatológicas e seguimento). Considerou-se como critério um nível de significância α de 5% e foram utilizados o *software* GPOWER (<http://www.gpower.hhu.de/>), o *link* disponibilizado pelo Laboratório de Epidemiologia e Estatística - Lee (<http://www.lee.dante.br/index.html>) e o *software* STATA 11.

3.8.7 Outras considerações estatísticas

Nosso estudo optou por não realizar correções para múltiplos testes nas análises de associações realizadas. Além disso, as análises estratificadas para o subtipo histológico de Lauren serão apresentadas somente para o subtipo difuso (N=112). Os resultados para o subtipo intestinal foram removidos devido ao número amostral reduzido para esse grupo (N=59). Nas análises envolvendo os haplótipos serão apresentados os resultados para o estudo caso-controle e para as associações com as características anatomopatológicas; foram excluídos os resultados de associação com as curvas de sobrevida. Além disso, também não serão mostrados os resultados estratificados para os diferentes subtipos histológicos.

Todas essas considerações serão retomadas com maiores detalhes na Seção de Discussão desse estudo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A Figura 9 representa a forma didática escolhida para apresentar os resultados obtidos em nosso estudo.

As associações que buscam marcadores genéticos de **suscetibilidade** (estudo caso-controle), **progressão** (associação com as características anatomopatológicas) e **prognóstico** (associação com sobrevida global e livre de doença) para o câncer gástrico foram realizadas considerando-se os polimorfismos individualmente (todos os Modelos Genéticos) na amostra total (N=178), depois estratificando somente para os casos com subtipo histológico difuso (N=112) e, posteriormente, considerando-se os haplótipos formados pelos polimorfismos em desequilíbrio de ligação.

As análises com os haplótipos consideraram somente a amostra total de casos (N=178), uma vez que o poder estatístico seria muito reduzido se considerássemos o subgrupo de casos com subtipo histológico difuso e a frequência reduzida que cada haplótipo encontrado na nossa população.

Além disso, não foi realizada análise de associação dos haplótipos com sobrevida total e livre de doença, pela mesma razão de perda de poder estatístico devido ao baixo número amostral representado para cada haplótipo e considerando-se o número de eventos/desfechos/dados censurados para ambas as variáveis.

Figura 9. Representação esquemática das análises de associação realizadas em nosso estudo

4.1 SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER GÁSTRICO (Estudo Caso-Controle)

4.1.1 Descrição da amostra de casos e controles

A Tabela 5 descreve as características gerais da amostra composta por 262 controles e 178 casos com câncer gástrico. O desenho inicial do estudo foi conduzido com o intuito de parear as amostras de casos e controles por gênero e idade, porém muitos indivíduos foram excluídos após criteriosa revisão e seleção de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente definidos.

A média (desvio-padrão) de idade observada no grupo de controle foi de 58,7 (16,4), enquanto que no grupo de casos foi de 61,8 (13,3) e 59,8 (14,2) anos, considerando-se a amostra total de casos e estratificando para o subtipo histológico difuso, respectivamente. Observamos diferença de idade quando comparamos o grupo controle com a amostra total de casos (Tabela 6).

Os grupos de casos e controles não diferiram quanto etnia e nível de escolaridade ($p>0,05$), porém diferiram quanto ao gênero, uso de tabaco e álcool ($p<0,05$). De maneira geral, os casos apresentaram maior frequência do sexo masculino, além de apresentarem maior prevalência de uso de tabaco e álcool (tanto no passado, quanto no momento atual) quando comparados ao grupo de controles (Tabela 5).

Quando ajustados em modelo de regressão logística, o consumo de álcool e o uso de tabaco demonstraram atuar como fatores de risco independentes para o câncer de estômago ($OR>1$), considerando-se tanto a amostra total de casos quanto a estratificada para o subtipo histológico difuso.

Por essa razão, todas as análises multivariadas subsequentes utilizaram gênero, idade, etilismo e tabagismo como covariáveis de ajuste.

Tabela 5. Características gerais da amostra estudada e comparação das variáveis Idade, Gênero, Etnia, Nível educacional, Tabagismo e Etilismo entre controles e casos com câncer gástrico (amostral total e considerando somente casos com o subtipo histológico difuso)

Variável	CONTROLES				CASOS						
	Amostra Total N (%)	Amostra Total N (%)	χ^2/U	p	OR (IC 95%)	p [#]	Subtipo Difuso N (%)	χ^2/U	p	OR (IC 95%)	p [#]
	N=262	N=178					N=112				
Idade											
Média em anos (DP)	58,7 (16,4)	61,8 (13,3)	21155	0,098 ^a	1,0 (1,00-1,03)	0,04*	59,84 (14,2)	14396	0,773 ^a	1,01 (0,99-1,02)	0,53
Gênero											
Feminino	143 (54,6)	69 (38,8)	10,6	0,001 ^{b,*}	1 (Referência)		42 (37,5)	9,157	0,002 ^{b,*}	1 (Referência)	
Masculino	119 (45,4)	109 (61,2)			1,9 (1,3-2,8)	<0,001*	70 (62,5)			2,0 (1,3-3,2)	0,003*
Etnia											
Branco	214 (82,3)	134 (75,3)	6,05	0,108 ^b	1 (Referência)		84 (75,0)	4,508	0,212 ^b	1 (Referência)	
Pardo	25 (9,6)	25 (14,0)			1,6 (0,9-2,9)	0,12	16 (14,3)			1,63 (,8-3,2)	0,16
Negro	18 (6,9)	12 (6,7)			1,1 (0,5-2,3)	0,87	8 (7,1)			1,13 (0,5-2,7)	0,78
Amarelo	3 (1,2)	7 (3,9)			3,7 (0,9-14,6)	0,06	4 (3,6)			3,4 (0,7-15,5)	0,11
Nível educacional											
0 a 5 anos	56 (23,5)	44 (26,2)	7,024	0,068 ^b	1 (Referência)		28 (26,4)	6,119	0,106 ^b	1 (Referência)	
6 a 9 anos	124 (52,1)	103 (61,3)			1,0 (0,6-1,6)	0,96	66 (62,3)			1,02 (0,6-1,7)	0,96
10 a 12 anos	42 (17,6)	14 (8,3)			0,6 (0,3-1,1)	0,10	8 (7,5)			0,51 (0,2-1,2)	0,13
> 12 anos	16 (6,7)	7 (4,2)			0,3 (0,1-1,1)	0,07	4 (3,8)			0,27 (0,1-1,2)	0,09
Tabagismo											
Nunca fumou	161 (61,5)	66 (37,1)	26,169	<0,001 ^{b,*}	1 (Referência)		40 (35,7)	24,112	<0,001 ^{b,*}	1 (Referência)	
Somente no passado	66 (25,2)	66 (37,1)			2,4 (1,6-23,8)	<0,001*	38 (33,9)			2,3 (1,4-3,9)	0,002*
Sim, ainda fuma	35 (13,4)	46 (25,8)			3,2 (1,9-5,4)	<0,001*	34 (30,4)			3,9 (2,2-7,0)	<0,001*
Etilismo											
Nunca	213 (81,3)	94 (52,8)	43,527	<0,001 ^{b,*}	1 (Referência)		55 (49,1)	42,335	<0,001 ^{b,*}	1 (Referência)	
Somente no passado	20 (7,6)	47 (26,4)			5,3 (3,0-9,5)	<0,001*	31 (27,7)			6,0 (3,2-11,3)	<0,001*
Sim, ainda bebe	29 (11,1)	37 (20,8)			2,9 (1,7-5,0)	<0,001*	26 (23,2)			3,5 (1,9-6,4)	<0,001*

N: Número de Indivíduos; DP: Desvio-padrão; ^aTeste de Mann-Whitney (U); ^bTeste Qui-Quadrado (χ^2); [#]Regressão Logística univariada; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança; *p<0,05

4.1.2 Associação entre os polimorfismos individuais e o câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178)

As frequências genotípicas e alélicas de cada polimorfismo estudado foram comparadas entre os grupos de casos e controles e estão apresentadas na Tabela 6. Além disso, também estão representados os resultados dos desvios do EHW na amostra avaliada e as frequências detectadas para os alelos polimórficos no banco de dados público do Projeto 1000 Genomas (<http://browser.1000genomes.org/index.html>), com acesso em 15 de dezembro de 2016.

Resultados

Continuação da Tabela 6

rs833061 (<i>VEGFA</i>)	-460T>C ou -1498T>C	chr6:43737486	<i>upstream</i>	TT TC CC	72 (40,4) 79 (44,4) 27(15,2)	91 (36,0) 121 (47,8) 41 (16,2)	0,89	0,64	37,4	40,1	0,67	0,41	37,0	0,26	0,61
rs2010963 (<i>VEGFA</i>)	+405G>C ou -634G>C	chr6:43738350	5'-UTR	GG GC CC	68 (38,4) 82 (46,3) 27 (15,3)	114 (43,8) 117 (45,0) 29 (11,2)	2,17	0,34	38,4	33,7	2,09	0,15	32,6	0,02	0,89
rs3025039 (<i>VEGFA</i>)	+936C>T	chr6:43752536	3'-UTR (éxon 8)	CC CT TT	125 (70,6) 46 (26,0) 6 (3,4)	177 (70,0) 74 (29,2) 2 (0,8)	4,19	0,12	16,4	15,4	0,15	0,70	13,4	0,99	0,32
rs763780 (<i>IL17F</i>)	7488A>G	chr6:52101739	<i>missense</i> (His→Arg)	AA AG GG	153 (86,0) 20 (11,2) 5 (2,8)	210 (91,3) 18 (7,8) 2 (0,9)	3,78	0,15	8,4	4,8	4,47	0,035*	9,4	19,7	<0,001*
rs4644 (<i>LGALS3</i>)	+191A>C ou Pro64His	chr14:55604935	<i>missense</i> (Pro→His)	CC AC AA	89 (50,0) 72 (40,4) 17 (9,6)	125 (49,4) 111 (43,9) 17 (6,7)	1,36	0,51	29,8	28,7	0,13	0,72	29,3	0,35	0,55
rs6917 (<i>PHB</i>)	1630C>T	chr17:47481543	3'-UTR	CC CT TT	125 (70,2) 48 (27,0) 5 (2,8)	169 (68,1) 74 (29,8) 5 (2,0)	0,64	0,73	16,3	16,9	0,06	0,80	16,7	0,41	0,52
rs1042522 (<i>TP53</i>)	Arg72Pro	chr17:7579472	<i>missense</i> (Arg→Pro)	GG GC CC	59 (33,1) 89 (50,0) 30 (16,9)	118 (48,8) 80 (33,1) 44 (18,2)	13,35	0,001*	41,9	34,7	4,45	0,035*	45,7	8,68	0,003*
rs121912664 (<i>TP53</i>) ^a	p.R337H, c.1010G>A ou Arg337His	chr17:7574017	<i>missense</i> (Arg→His)	GG GA AA	0 (0,0) 0 (0,0) 0 (0,0)	0 (0,0) 0 (0,0) 0 (0,0)	-	-	0,0	0,0	-	-	-	-	-

N: número de indivíduos; ^avariação genética descrita como mutação não como polimorfismo; chr: cromossomo; UTR: *untranslated region*; [#]Modelo de Genótipos; ^{\$}Modelo de Alelos; MAF: *Minor allele frequency* (frequência do alelo polimórfico); MAF 1000Genomes: frequência do alelo polimórfico baseada no Projeto 1000 Genomas, acesso em 15 de dezembro de 2016; ^aInformação baseada no UCSC *Genome Browser* GRCh37/hg19; EHW: Equilíbrio de Hardy Weinberg (considerado p<0,01); *p<0,05

Além dos Modelos de Genótipos e Alelos (apresentados na tabela acima), todos esses polimorfismos foram avaliados também para os Modelos Dominante e Recessivo (dados não apresentados). Além disso, foram também estimados modelos de regressão logística, devidamente ajustados para as variáveis de confusão, com cálculo do OR para calcular o risco associado à variante polimórfica em prever o câncer gástrico. A Tabela 7 apresenta os resultados dos polimorfismos que foram significativamente associados e/ou apresentaram tendência de associação ao câncer gástrico: rs699947 (*VEGFA*), rs763780 (*IL17F*) e rs1042522 (*TP53*).

Para as análises multivariadas, incluímos gênero, idade, etilismo e tabagismo como covariáveis de ajuste, pois demonstraram associação com o câncer gástrico nas análises univariadas (Tabela 5). Para as análises multivariadas, o genótipo homozigoto selvagem foi considerado como referência nos Modelos de Genótipo e Dominante, enquanto que a presença do alelo selvagem foi utilizada como referência nos Modelos de Alelos e Recessivo.

Resultados

Tabela 7. Resultado das associações entre os polimorfismos rs1042522 (*TP53*), rs699947 (*VEGFA*) e rs763780 (*IL17F*) e o câncer gástrico (amostra total) nos diferentes modelos genéticos e o cálculo da razão de chances (*Odds ratio*), após ajuste para covariáveis associadas independentemente nas análises univariadas

Polimorfismo (Gene)	Modelo Genético	Genótipos	Casos N (%)	Controles N (%)	p	OR (IC 95%) ^a	p ^a
			Amostra Total N=178	Amostra Total N=262			
rs1042522 (<i>TP53</i>)	Genótipos	GG	59 (33,1)	118 (48,8)	0,001*	1 (Referência)	<0,001*
		GC	89 (50,0)	80 (33,1)		2,30 (1,4-3,7)	
		CC	30 (16,9)	44 (18,2)		1,58 (0,9-2,9)	
	Dominante	GG	59 (33,1)	118 (48,8)	0,001*	1 (Referência)	0,001*
		GC+CC	119 (66,9)	124 (51,2)		2,07 (1,3-3,2)	
	Recessivo	GG+GC	148 (83,1)	198 (81,8)	0,724	1 (Referência)	0,945
		CC	30 (16,9)	44 (18,2)		1,02 (0,59-1,8)	
	Alelos	alelo G	207 (58,1)	316 (65,3)	0,035*	1 (Referência)	0,017*
		alelo C	149 (41,9)	168 (34,7)		1,45 (1,1-2,0)	
rs699947 (<i>VEGFA</i>)	Genótipos	CC	80 (44,9)	93 (36,2)	0,160	1 (Referência)	0,053
		CA	75 (42,1)	120 (46,7)		0,64 (0,4-1,0)	
		AA	23 (12,9)	44 (17,1)		0,51 (0,3-0,9)	
	Dominante	CC	80 (44,9)	93 (36,2)	0,067	1 (Referência)	0,021*
		CA+AA	98 (55,1)	164 (63,8)		0,61 (0,4-0,9)	
	Recessivo	CC+AC	155 (87,1)	213 (82,9)	0,233	1 (Referência)	0,151
		AA	23 (12,9)	44 (17,1)		0,65 (0,4-1,2)	
	Alelos	alelo C	235 (66,0)	306 (59,5)	0,053	1 (Referência)	0,016*
		alelo A	121 (34,0)	208 (40,5)		0,69 (0,5-0,9)	
rs763780 (<i>IL17F</i>)	Genótipos	AA	153 (86,0)	210 (91,3)	0,150	1 (Referência)	0,241
		AG	20 (11,2)	18 (7,8)		1,55 (0,7-3,2)	
		GG	5 (2,8)	2 (0,9)		2,52 (0,4-15,0)	
	Dominante	AA	153 (86,0)	210 (91,3)	0,087	1 (Referência)	0,144
		AG+GG	25 (14,0)	20 (8,7)		1,66 (0,8-3,3)	
	Recessivo	AA+AG	173 (97,2)	228 (99,1)	0,135	1 (Referência)	0,330
		GG	5 (2,8)	2 (0,9)		2,43 (0,4-14,5)	
	Alelos	alelo A	326 (91,6)	438 (95,2)	0,035*	1 (Referência)	0,091
		alelo G	30 (8,4)	22 (4,8)		1,70 (0,9-3,1)	

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança; ^aajustado para gênero, idade, etilismo e tabagismo; *p<0,05.

Foi detectada diferença estatisticamente significativa na comparação das distribuições das frequências genótípicas/alélicas do polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* entre casos e controles nos Modelos de Genótipos, Alelos e Dominante. De modo geral, houve maior frequência da presença do alelo polimórfico C (Pro) no grupo de casos quando comparado aos controles (Tabelas 6-7). As análises multivariadas mostraram risco aumentado para o câncer gástrico nesses três modelos genéticos, mesmo após ajuste para covariáveis de confusão. Indivíduos heterozigotos GC (Arg/Pro) apresentaram um risco 2,3 vezes maior em relação aos homozigotos GG (Arg/Arg) (Modelo de Genótipos); indivíduos portadores do alelo C (Pro) apresentaram risco 2,07 maior em relação aos homozigotos GG (Arg/Arg) (Modelo Dominante); a presença de cada alelo C (Pro) herdado aumentou o risco em 1,45 em relação ao alelo G (Arg) (Modelo de Alelos), ou seja, de acordo com esse modelo multiplicativo, um indivíduo portador do genótipo CC apresentaria cerca de 2,10 vezes maior risco ($1,45 \times 1,45$) de desenvolver câncer gástrico do que portadores do genótipo GG (Tabela 7).

O Modelo de Alelos demonstrou uma associação significativa entre as frequências alélicas do polimorfismo rs763780 do gene *IL17F* e o câncer gástrico (Tabela 6). A associação não foi observada nos demais Modelos Genéticos avaliados, além de perder a significância após ajuste de modelo de regressão logística, ajustado para covariáveis de confusão (Tabela 7).

Como foi observada uma tendência de associação entre rs699947 do gene *VEGFA* e o câncer gástrico no Modelo de Alelos ($p=0,053$; Tabela 7), avaliamos se houve associação nos demais Modelos Genéticos, além de construir os modelos multivariados. Foi detectado que, após ajuste para covariáveis de confusão, esse polimorfismo foi capaz de prever proteção ao câncer gástrico nos Modelos de Genótipos, Dominante e de Alelos. Indivíduos com genótipo AA apresentaram 0,51 do risco dos indivíduos homozigotos CC em desenvolver câncer gástrico (Modelo Genótipos); indivíduos portadores do alelo A apresentaram 0,61 do risco dos homozigotos CC (Modelo Dominante); e o alelo A apresentou 0,69 do risco em relação ao alelo C (Modelo de Alelos), ou seja, indivíduos AA apresentam 0,48 vezes ($0,69 \times 0,69$) do risco observado para indivíduos CC (Tabela 7).

Não foram encontradas associações significativas entre os demais polimorfismos estudados e o câncer gástrico ($p>0,05$). Além disso, não foi detectado nenhum indivíduo

portador da mutação fundadora p.R337H do gene *TP53* em nossa amostra, em ambos os grupos de casos e controles (Tabela 6).

Em relação ao EHW, nosso estudo encontrou alguns polimorfismos que desviaram do Equilíbrio: rs5275 (*COX-2*), rs763780 (*IL17F*) e rs1042522 (*TP53*) (Tabela 6). Porém, quando estratificamos para os grupos de casos e controles, para os polimorfismos *COX-2* e *TP53*, o grupo que apresentou desvio do Equilíbrio foi o dos indivíduos controles (*COX-2*: $\chi^2 = 17,73$; $p < 0,001$ e *TP53*: $\chi^2 = 17,73$; $p < 0,001$) e não o de casos ($p > 0,05$) e, portanto, utilizamos esses polimorfismos nas associações com as características anatomopatológicas.

4.1.3 Associação entre os polimorfismos individuais e o câncer gástrico, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Considerando a estratificação da amostra para os casos com subtipo histológico difuso de Lauren, evidenciamos uma associação entre o polimorfismo de *TP53* e um risco ainda maior (cerca de três vezes) para o desenvolvimento do câncer gástrico (Modelos de Genótipos, Dominante e Alelos), mesmo quando corrigido para as variáveis de confusão (Tabela 8).

Nesse subgrupo amostral não observamos o efeito protetor do polimorfismo rs699947 de *VEGFA* observado quando analisamos a amostra total (dados não apresentados).

Em relação ao subtipo histológico intestinal, não foram observadas associações entre os polimorfismos e o câncer gástrico ($p > 0,05$; dados não apresentados). Devido ao número amostral reduzido para essas análises (N=59), esses resultados possuem baixo poder estatístico e devem ser interpretados com muita cautela. Dessa forma, optamos por excluir esses dados do estudo.

Resultados

Tabela 8. Resultado das associações entre o polimorfismo rs1042522 (*TP53*) e o câncer gástrico (considerando-se somente os casos com subtipo histológico difuso) nos diferentes modelos genéticos e o cálculo da razão de chances (*Odds ratio*), após ajuste para covariáveis associadas independentemente nas análises univariadas

Polimorfismo (Gene)	Modelo Genético	Genótipos	Casos N (%)	Controles N (%)	p	OR (IC 95%) ^a	p ^a
			Subtipo difuso N=112	Amostra Total N=262			
rs1042522 (<i>TP53</i>)	Genótipos	GG	32 (28,6)	118 (48,8)	0,001*	1 (Referência)	<0,001*
		GC	56 (50,0)	80 (33,1)		3,0 (1,7-5,3)	
		CC	24 (21,4)	44 (18,2)		2,6 (1,3-5,3)	
	Dominante	GG	32 (28,6)	118 (48,8)	<0,001*	1 (Referência)	<0,001*
		GC+CC	80 (71,4)	124 (51,2)		2,9 (1,7-4,9)	
	Recessivo	GG+GC	88 (78,6)	198 (81,8)	0,471	1 (Referência)	0,254
		CC	24 (21,4)	44 (18,2)		1,4 (0,8-2,6)	
	Alelos	alelo G	120 (53,6)	316 (65,3)	0,003*	1 (Referência)	0,001*
		alelo C	104 (46,4)	168 (34,7)		1,9 (1,3-2,7)	

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança; ^aajustado para gênero, idade, etilismo e tabagismo; *p<0,05

4.1.4 Associação entre os haplótipos e o câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178)

As análises de haplótipos incluíram os polimorfismos dos genes *TNFB*, *TNFA*, *HSPA1L*, *HSPA1B* e *VEGFA*, localizados no cromossomo 6 (Figura 5) e foram realizadas por meio dos *softwares* Haploview 4.2 e PLINK. Um dos pré-requisitos para a análise de haplótipos é obedecer ao EHW ($p > 0,01$) e, por essa razão, o polimorfismo de *IL17F* (também localizado no cromossomo 6) foi excluído dessa análise (não se apresentou EHW em ambos os grupos, de casos e controles). Da mesma forma, esse foi o motivo pelo qual não foi avaliada a associação entre os haplótipos formados pelos polimorfismos de *COX-2* e o câncer gástrico, uma vez que o polimorfismo rs5275 não se apresentou em Equilíbrio no grupo de controles.

Inicialmente foram calculados os valores de D' entre os polimorfismos, a fim de verificar quais deles apresentavam-se em desequilíbrio de ligação em nossa amostra total de casos (N=178) e controles (N=262) (foram considerados valores de D' maiores que 0,75 para o desequilíbrio de ligação). O valor de D' é uma medida que estima o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos e quanto maior o seu valor, maior é a ligação entre os polimorfismos em questão.

Os valores de D' demonstraram que os seguintes polimorfismos encontraram-se em desequilíbrio de ligação: rs909253 e rs1800629 (*TNFB* e *TNFA*, respectivamente; $D' = 0,87$), rs2227956 e rs1061581 (*HSPA1L* e *HSPA1B*, respectivamente; $D' = 0,75$) e rs699947, rs833061 e rs2010963 (*VEGFA*; $D' = 0,98$). Os blocos haplotípicos formados pelos polimorfismos de *TNF*, *HSP70* e *VEGFA* foram didaticamente chamados de blocos 1, 2 e 3, respectivamente, e estão apresentados na Figura 10.

Figura 10. Representação dos três blocos de haplótipos (blocos 1 a 3), cujos polimorfismos encontraram-se em desequilíbrio de ligação em nossa amostra total de casos e controles. Entre parênteses está representado o tamanho em kilobases (kb) de cada bloco. Os valores de D' estão apresentados em porcentagem dentro dos losangos e representam o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos (quanto maior o valor de D', maior é a intensidade da cor vermelha e maior é o desequilíbrio de ligação). Adaptação da figura gerada pelo *software* Haploview 4.2

As frequências dos blocos haplotípicos formados pelos polimorfismos que apresentaram desequilíbrio de ligação foram comparadas entre casos e controles a fim de avaliar a associação com o câncer gástrico (Tabela 9). Não foram detectadas associações significativas entre os blocos 1 ou 2 e o câncer gástrico ($p > 0,05$). Porém, foi encontrada diferença significativa das frequências do haplótipo CTC (bloco 3) entre casos e controles ($p = 0,006$), de modo que a sua frequência foi maior nos pacientes com câncer gástrico (37,6%) em relação aos controles (28,6%). Além disso, os haplótipos ATG e CCC também apresentaram associações significantes, com maior frequência em controles do que em casos ($p < 0,001$).

Tabela 9. Associação entre os blocos de haplótipos formados pelos polimorfismos em desequilíbrio de ligação em nossa amostra e o câncer gástrico

Blocos	Polimorfismos (genes)	Haplótipos	freq (%)	Casos/Controles (%)	χ^2	p
1	rs909253 e rs1800629 (<i>TNFB/TNFA</i>)	AG	64,4	64,3/64,4	0,00	0,98
		GG	21,9	22,5/21,5	0,11	0,74
		GA	12,6	11,6/13,4	0,60	0,44
		AA	1,1	1,6/0,7	1,49	0,22
2	rs2227956 e rs1061581 (<i>HSPA1L/HSPA1B</i>)	TG	54,2	57,0/52,2	1,89	0,17
		TA	38,0	36,3/39,3	0,80	0,37
		CA	6,7	5,2/7,8	2,13	0,14
		CG	1,1	1,5/0,7	1,24	0,27
3	rs699947, rs833061 e rs2010963 (<i>VEGFA</i>)	ACG	32,8	33,3/32,4	0,08	0,78
		CTC	32,4	37,6/28,6	7,66	0,006*
		CTG	23,3	24,7/22,3	0,69	0,40
		ATG	4,7	0,3/8,0	26,51	<0,001*
		CCG	3,4	3,1/3,7	0,21	0,65
		CCC	3,2	0,6/5,1	13,11	<0,001*

freq: frequência na qual o haplótipo foi observado na amostra total; *p<0,05

Os resultados das análises de haplótipos para o estudo caso-controle foram apresentados somente para a amostra total de casos (N=178). Optamos por não apresentar os resultados estratificados por subtipo histológico (detalhes na Seção de Discussão).

4.1.5 RESULTADOS PARA OS MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER GÁSTRICO

A Tabela 10 resume os resultados encontrados nesse estudo para as análises que buscaram marcadores genéticos de suscetibilidade ao câncer gástrico. Identificamos que o polimorfismo rs1042522 do gene *TP53* atuou como fator de risco, considerando a amostra total ou estratificada para os casos com subtipo histológico difuso; o polimorfismo rs699947 do gene *VEGFA* atuou como fator de proteção na amostra total; e o haplótipo CTC do gene *VEGFA*, formado pelos polimorfismos rs699947, rs833061 e rs2010963, demonstrou ser um fator de maior suscetibilidade ao câncer gástrico.

Tabela 10. Polimorfismos e haplótipos associados à suscetibilidade ao câncer gástrico em nosso estudo, considerando a amostra total de casos (N=178) ou estratificada para o subtipo histológico difuso (N=112)

Polimorfismos (gene)	Casuística	Suscetibilidade	Modelo Genético	Alelo ou haplótipo associado	% MAF	
					Casos	Controles
rs1042522 (<i>TP53</i>)	Amostra total	Risco	Genótipos, Alelos e Dominante	Alelo C (Pro)	41,9	34,7
	Subtipo difuso	Risco	Genótipos, Alelos e Dominante	Alelo C (Pro)	46,4	34,7
rs699947 (<i>VEGFA</i>)	Amostra total	Proteção	Genótipos, Alelos e Dominante	Alelo A (<i>upstream</i>)	34,0	40,5
rs699947, rs833061 e rs2010963 (<i>VEGFA</i>)	Amostra total	Risco	Haplótipos	Haplótipo CTC (32,4%) [§] -2578C>A (<i>upstream</i>), -1498T>C (<i>upstream</i>) e +405G>C (5'-UTR)	37,6	28,6

MAF: *minor allele frequency* (frequência do alelo polimórfico);[§] frequência na qual o haplótipo foi observado na amostra total desse estudo

4.2 PROGRESSÃO DO CÂNCER GÁSTRICO (Características Anatomopatológicas)

4.2.1 Descrição das características anatomopatológicas do câncer gástrico

Os laudos anatomopatológicos foram minuciosamente revisados pela aluna e as características anatomopatológicas ao diagnóstico estão descritas na Tabela 11. Os dados estão apresentados considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178) e separadamente para o subtipo histológico difuso (N=112) ou intestinal (N=59).

Tabela 11. Características anatomopatológicas dos casos com câncer gástrico ao diagnóstico (amostra total e estratificada por subtipo histológico)

Variável	Casos N (%)		
	Amostra Total N=178	Subtipo Difuso N=112	Subtipo Intestinal N=59
Idade ao diagnóstico			
média (DP) anos	61,8 (13,3)	59,8 (14,2)	64,6 (10,4)
Tipo Histológico			
Intestinal	59 (33,2)	-	59 (100,0)
Difuso	112 (62,9)	112 (100,0)	-
Misto	7 (3,9)	-	-
Tamanho do tumor			
média (DP) cm	5,9 (3,3)	5,7 (2,8)	5,7 (3,5)
até 5 cm	94 (52,8)	61 (54,5)	33 (55,9)
acima de 5 cm	84 (47,2)	51 (45,5)	26 (44,1)
Invasão perineural			
não	76 (44,2)	38 (34,9)	34 (60,7)
sim	96 (55,8)	71 (65,1)	22 (39,3)
Invasão linfática			
não	68 (39,5)	38 (34,5)	27 (49,1)
sim	104 (60,5)	72 (65,5)	28 (50,9)
Invasão sanguínea			
não	81 (49,4)	44 (43,6)	33 (58,9)
sim	83 (50,6)	57 (56,4)	23 (41,1)
Infiltrado inflamatório			
ausente	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
leve	50 (49,5)	34 (53,1)	15 (50,0)
moderado	42 (41,6)	27 (42,2)	11 (36,7)
intenso	9 (8,9)	3 (4,7)	4 (13,3)

Continuação da Tabela 11

Variável	Casos N (%)		
	Amostra Total N=178	Subtipo Difuso N=112	Subtipo Intestinal N=59
Desmoplasia			
ausente	2 (1,9)	1 (1,5)	1 (3,4)
leve	37 (35,9)	17 (25,4)	16 (55,2)
moderada	42 (40,8)	31 (46,3)	10 (34,5)
intensa	22 (21,4)	18 (26,9)	2 (6,9)
Profundidade de invasão (pT)			
t1	15 (8,5)	5 (4,5)	10 (16,9)
t2	21 (11,9)	15 (13,5)	6 (10,2)
t3	33 (18,6)	18 (16,2)	11 (18,6)
t4	108 (61,0)	73 (65,8)	32 (54,2)
Invasão para outros órgãos (pT4b)			
não	172 (96,6)	108 (96,4)	57 (96,6)
sim	6 (3,4)	4 (3,6)	2 (3,4)
Comprometimento linfonodal (pN)			
N0	40 (22,6)	17 (15,3)	23 (39,0)
N1	28 (15,8)	15 (13,5)	11 (18,6)
N2	38 (21,5)	23 (20,7)	12 (20,3)
N3	71 (40,1)	56 (50,5)	13 (22,0)
Metástase linfonodal			
não	40 (22,6)	17 (15,3)	23 (39,0)
sim	137 (77,4)	94 (84,7)	36 (61,0)
Metástase à distância (pM)			
não	152 (85,4)	94 (83,9)	52 (88,1)
sim	26 (14,6)	18 (16,1)	7 (11,9)
Estadiamento			
I	24 (13,6)	11 (9,9)	13 (22,0)
II	30 (16,9)	16 (14,4)	13 (22,0)
III	97 (54,8)	66 (59,5)	26 (44,1)
IV	26 (14,7)	18 (16,2)	7 (11,9)

N: Número de Indivíduos; DP: desvio-padrão

A classificação TNM foi baseada na 7ª edição estabelecida pela UICC/AJCC

A média (e desvio-padrão) de idade ao diagnóstico foi de 61,8 (13,3) anos, variando de 21 a 93 anos. O tamanho tumoral foi avaliado baseando-se no diâmetro máximo do tumor gástrico, que variou entre 0,8 e 20 cm, com um valor médio de 5,9 (3,3) cm. Essa variável também foi categorizada considerando-se tumores com tamanho ≤ 5 cm e > 5 cm, sendo que 47,1% dos casos apresentaram tumores maiores que 5 cm.

As análises envolvendo o tamanho tumoral consideraram tanto a variável na forma numérica, como na forma categorizada.

Em nosso estudo, 55,8% dos pacientes apresentaram invasão perineural, 60,5% apresentaram invasão linfática e 50,6% apresentaram invasão sanguínea. A presença de desmoplasia e infiltrado inflamatório classificado como “moderado a intenso” estavam presentes em 62,2% e 50,5% da amostra, respectivamente.

Os pacientes foram avaliados para profundidade da invasão tumoral (pT), presença de acometimento linfonodal (pN) e presença de metástase à distância (pM) e, posteriormente, o pTNM foi utilizado para classificar o estadiamento de acordo com os critérios propostos pela UICC/AJCC em 2010. Em relação à invasão da parede tumoral (pT), 8,5% da amostra apresentou tumor precoce (pT1) e 81,5% apresentou tumores avançados (pT2-T4). Além disso, somente 3,4% dos casos apresentaram invasão de outros órgãos (pT4b).

Em relação ao acometimento linfonodal (pN), 22,6% dos pacientes não apresentaram (N0) e 77,4% apresentaram metástase linfonodal, sendo subdivididos nas seguintes classificações: 15,8% com 1 a 2 linfonodos regionais positivos (N1); 21,5% entre 3 e 6 linfonodos positivos (N2) e 40,1% com mais de 7 linfonodos comprometidos (N3). Em relação à doença metastática, 14,6% dos casos apresentaram metástase à distância (nessa amostra foram observadas metástases peritoneais, hepáticas, em mesocólon, pâncreas e cólon).

De acordo com o estadiamento da doença, houve maior prevalência de pacientes diagnosticados e submetidos à cirurgia em estágio III ou IV da doença (69,5%). Pacientes diagnosticados em estágio I e II corresponderam a 13,5% e 16,9% da amostra, respectivamente.

Quando classificadas de acordo com o subtipo histológico de Lauren, observamos um predomínio do subtipo difuso (62,9%).

Quando comparamos os dados anatomopatológicos entre os subtipos histológicos de Lauren, observamos que o subtipo difuso apresentou maior prevalência de invasão perineural ($p=0,002$), desmoplasia “moderada a intensa” ($p=0,003$), presença de metástase linfonodal ($p=0,001$) e estadiamento mais avançado ($p=0,008$) quando comparado ao subtipo intestinal (Tabela 12). Além disso, a idade de acometimento também foi mais precoce, com média (DP) de 59,8 (14,2) anos, quando comparado ao subtipo intestinal, que teve diagnóstico com 64,6 (10,4) anos ($p=0,017$).

Para calcular o risco que o subtipo histológico difuso tem em prever essas variáveis (que são relacionadas a uma pior evolução da doença), foram ajustados modelos de regressão logística para cada uma das variáveis associadas independentemente, com cálculo do OR (Tabela 12). O subtipo difuso foi capaz de prever risco aumentado para essas quatro variáveis anatomopatológicas, que estão relacionadas a uma pior evolução da doença.

Tabela 12. Associação entre o subtipo histológico difuso de Lauren e as características anatomopatológicas de pior progressão do câncer gástrico, com respectivos valores de *Odds ratio*

Características anatomopatológicas	Subtipo histológico	Categorias N (%)		χ^2	p	OR (IC 95%)	p
Infiltrado perineural		Não	Sim				
	Intestinal	34 (47,2)	22 (23,7)	10,1	0,002*	1 (Referência)	
	Difuso	38 (52,8)	71 (76,3)			2,9 (1,5-5,6)	0,002*
Desmoplasia		Ausente a leve	Moderada a intensa				
	Intestinal	17 (48,6)	12 (19,7)	8,8	0,003*	1 (Referência)	
	Difuso	18 (51,4)	49 (80,3)			3,9 (1,5-9,6)	0,004*
Metástase linfonodal		Não	Sim				
	Intestinal	23 (57,5)	36 (27,7)	12,0	0,001*	1 (Referência)	
	Difuso	17 (42,5)	94 (72,3)			3,5 (1,7-7,4)	0,001*
Estadiamento		I+II	III+IV				
	Intestinal	26 (49,1)	33 (28,2)	7,0	0,008*	1 (Referência)	
	Difuso	27 (50,9)	84 (71,8)			2,5 (1,3-4,8)	0,009*

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança; *p<0,05

As demais variáveis anatomopatológicas (tamanho do tumor, invasão linfática, invasão sanguínea, infiltrado inflamatório, profundidade de invasão, invasão para outros órgãos e metástase a distância) não diferiram entre os subtipos histológicos difuso e intestinal (dados não apresentados).

Além disso, verificamos se o perfil de infiltrado inflamatório estava associado com uma pior progressão da doença. A única variável anatomopatológica associada a um maior perfil de infiltrado inflamatório foi a maior presença de desmoplasia moderada a intensa (p<0,05; dados não apresentados).

4.2.2 Associação entre os polimorfismos individuais e as características anatomopatológicas do câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178)

Inicialmente verificamos se as frequências de cada genótipo apresentaram diferenças entre as categorias das variáveis anatomopatológicas avaliadas, nos quatro modelos genéticos propostos (Modelo Genótipos, Dominante, Recessivo e Alelos), por meio do teste de χ^2 ou Exato de Fisher. Em seguida, foram ajustados modelos de regressão logística, a fim de verificar se esses polimorfismos seriam capazes de prever as variáveis anatomopatológicas associadas. Os valores de *Odds Ratio* representam a chance que portadores de um determinado genótipo/alelo possuem em apresentar o fenótipo, em relação ao genótipo/alelo selvagem (utilizados com referência nas análises). As variáveis demográficas não apresentaram associação com as características anatomopatológicas em análises univariadas (dados não mostrados) e, portanto, nenhuma variável foi utilizada como covariável de ajuste nos modelos de regressão logística apresentados abaixo.

Dado o grande número de análises realizadas, serão apresentadas somente as características anatomopatológicas que foram significativamente associadas a cada polimorfismo estudado em pelo menos um dos modelos genéticos testados.

4.2.2.1 Polimorfismo rs689466 (gene *COX-2*)

Foi observada associação significativa entre o polimorfismo rs689466 de *COX-2* e a presença de Invasão linfática (Modelo de Genótipos), porém, quando ajustado em modelo de regressão logística, essa significância foi perdida. Além disso, o alelo G foi associado a uma maior frequência do subtipo histológico intestinal de Lauren (Modelo de Alelos), conferindo risco para o mesmo (Tabela 13).

Tabela 13. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs689466 (gene *COX-2*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs689466 (gene <i>COX-2</i>) N (%)						
		Modelo de Genótipos				Modelos de Alelos		
		AA	AG	GG	p	A	G	p
Invasão Linfática	Não	50 (73,5)	14 (20,6)	4 (5,9)	0,029*	114 (83,8)	22 (16,2)	0,54
	Sim	66 (63,5)	37 (35,6)	1 (1,0)		169 (81,3)	39 (18,8)	
	OR (IC 95%)	1,0	2,0 (0,98-4,10) ^a	0,19 (0,02-1,75) ^c		1,0	1,20 (0,67-2,12)	0,54
Subtipo histológico	Intestinal	34 (57,6)	22 (37,3)	3 (5,1)	0,10	90 (76,3)	28 (23,7)	0,039*
	Difuso	81 (72,3)	29 (25,9)	2 (1,8)		191 (85,3)	33 (14,7)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,55 (1,28-1,10) ^b	0,28 (0,05-1,75) ^d		1,0	0,56 (0,32-0,98)	0,04*

Continuação da Tabela 13

Características	Categorias	Polimorfismo rs689466 (gene <i>COX-2</i>) N (%)						
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante			
		AA+AG	GG	p	AA	AG+GG	p	
Invasão Linfática	Não	64 (94,1)	4 (5,9)	0,08	50 (73,5)	18 (26,5)	0,17	
	Sim	103 (99,0)	1 (1,0)		66 (63,5)	38 (36,5)		
	OR (IC 95%)	1,0	0,16 (0,02-1,42)	0,10	1,0	1,60 (0,82-3,13)	0,17	
Subtipo histológico	Intestinal	56 (94,9)	3 (5,1)	0,22	34 (57,6)	25 (42,4)	0,052	
	Difuso	110 (98,2)	2 (1,8)		81 (72,3)	31 (27,7)		
	OR (IC 95%)	1,0	0,34 (0,06-2,09)	0,24	1,0	0,52 (0,27-1,01)	0,052	

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,06 e ^bp=0,09 (genótipo AG em relação ao AA); ^cp=0,14 e ^dp=0,17 (genótipo GG em relação ao AA); *p<0,05

4.2.2.2 Polimorfismo rs5275 (gene *COX-2*)

Foi observada associação significativa entre a presença do alelo C do polimorfismo rs5275 do gene *COX-2* e menor profundidade de invasão (t1+t2) e ausência de invasão perineural (Modelo Dominante). Em modelo de regressão logística observamos que o mesmo foi capaz de atuar como fator de proteção para ambas as variáveis (Tabela 14).

Tabela 14. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs5275 (gene *COX-2*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs5275 (gene <i>COX-2</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		TT	TC	CC	p	T	C	p
Profundidade de invasão	t1+t2	9 (25,0)	20 (55,6)	7 (19,4)	0,085	38 (52,8)	34 (47,2)	0,051
	t3+t4	64 (45,4)	56 (39,7)	21 (14,9)		184 (65,2)	98 (34,8)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,39 (0,17-0,94) ^a	0,42 (0,14-1,27) ^c		1,0	0,60 (0,35-1,01)	0,051
Invasão perineural	Não	24 (31,6)	39 (51,3)	13 (17,1)	0,11	87 (57,2)	65 (42,8)	0,11
	Sim	45 (46,9)	36 (37,5)	15 (15,6)		126 (65,6)	66 (34,4)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,49 (0,25-0,96) ^b	0,62 (0,25-1,50) ^d	0,29	1,0	0,70 (0,45-1,09)	0,11

Continuação da Tabela 14

Características	Categorias	Polimorfismo rs5275 (gene <i>COX-2</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		TT+TC	CC	p	TT	TC+CC	p
Profundidade de invasão	t1+t2	29 (80,6)	7 (19,4)	0,50	9 (25,0)	27 (75,0)	0,027*
	t3+t4	120 (85,1)	21 (14,9)		64 (45,4)	77 (54,6)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,73 (0,28-1,87)	0,51	1,0	0,40 (0,18-0,91)	0,03*
Invasão perineural	Não	63 (82,9)	13 (17,1)	0,79	24 (31,6)	52 (68,4)	0,042*
	Sim	81 (84,4)	15 (15,6)		45 (46,9)	51 (53,1)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,90 (0,40-2,02)	0,79	1,0	0,52 (0,28-0,98)	0,043*

N: número de indivíduos; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,04* e ^bp=0,04* (genótipo TC em relação ao TT); ^cp=0,13 e ^dp=0,29 (genótipo CC em relação ao TT), *p<0,05

4.2.2.3 Polimorfismo rs1052133 (gene *OGGI*)

Foi observada associação entre a presença de duas cópias do alelo G do polimorfismo rs1052133 de *OGGI* e desmoplasia variando de moderada a intensa e também a uma maior presença de invasão perineural (Modelo Recessivo). Porém, não foi possível calcular o valor do risco associado a esse alelo, em modelo de regressão logística, devido à ausência de indivíduos em uma das categorias dessas variáveis (Tabela 15).

Tabela 15. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs1052133 (gene *OGGI*) e o cálculo do Odds Ratio para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs1052133 (gene <i>OGGI</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		CC	CG	GG	p	C	G	p
Desmoplasia	Ausente a leve	27 (69,2)	12 (30,8)	0 (0,0)	0,140	66 (84,6)	12 (15,4)	0,21
	Moderada a intensa	41 (64,1)	17 (26,6)	6 (9,4)		99 (77,3)	29 (22,7)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,93 (0,39-2,26)	-	0,880	1,0	1,61 (0,77-3,38)	0,21
Invasão perineural	Não	50 (65,8)	26 (34,2)	0 (0)	0,052	126 (82,9)	26 (17,1)	0,27
	Sim	61 (63,5)	28 (29,2)	7 (7,3)		150 (78,1)	42 (21,9)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,88 (0,46-1,69)	-	0,710	1,0	1,36 (0,79-2,34)	0,27

Continuação da Tabela 15

Características	Categorias	Polimorfismo rs1052133 (gene <i>OGGI</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		CC+CG	GG	p	CC	CG+GG	p
Desmoplasia	Ausente a leve	39 (100)	0 (0,0)	0,049*	27 (69,2)	12 (30,8)	0,59
	Moderada a intensa	58 (90,6)	6 (9,6)		41 (64,1)	23 (35,9)	
	OR (IC 95%)	-	-	-	1,0	1,26 (0,54-2,95)	0,59
Invasão perineural	Não	76 (100)	0 (0,0)	0,016*	50 (65,8)	26 (34,2)	0,76
	Sim	89 (92,7)	7 (7,3)		61 (63,5)	35 (36,5)	
	OR (IC 95%)	-	-	-	1,0	1,10 (9,59-2,07)	0,76

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; *p<0,05

4.2.2.4 Polimorfismo rs909253 (gene *TNFB*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs909253 de *TNFB* e as características anatomopatológicas ($p>0,05$), considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178).

4.2.2.5 Polimorfismo rs1800629 (gene *TNFA*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs1800629 de *TNFA* e as características anatomopatológicas ($p>0,05$), considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178).

4.2.2.6 Polimorfismo rs2227956 (gene *HSPA1L*)

Foi observado que o polimorfismo rs2227956 de *HSPA1L* estava associado a uma menor presença de invasão perineural (Modelos de Alelos e Dominante) e a uma desmoplasia variando de ausente a leve (Modelos de Genótipos, Alelos e Dominante). A presença do alelo C demonstrou atuar como fator de proteção para essas variáveis em modelo de regressão logística (Tabela 16).

Tabela 16. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2227956 (gene *HSPAIL*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs2227956 (gene <i>HSPAIL</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		TT	TC	CC	P	T	C	p
Invasão perineural	Não	61 (80,3)	14 (18,4)	1 (1,3)	0,055	136 (89,5)	16 (10,5)	0,021*
	Sim	88 (91,7)	8 (8,3)	0 (0,0)		184 (95,8)	8 (4,2)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,40 (0,16-1,00)	-	0,055	1,0	0,37 (0,15-0,89)	0,045*
Desmoplasia	Ausente a leve	32 (82,1)	7 (17,9)	0 (0,0)	0,027*	71 (91,0)	7 (9,0)	0,032*
	Moderada a intensa	61 (95,3)	3 (4,7)	0 (0,0)		125 (97,7)	3 (2,3)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,23 (0,05-0,93)	-	0,039*	1,0	0,24 (0,06-0,97)	0,026*

Continuação da Tabela 16

Características	Categorias	Polimorfismo rs2227956 (gene <i>HSPAIL</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		TT+TC	CC	p	TT	TC+CC	p
Invasão perineural	Não	75 (98,7)	1 (1,3)	0,442	61 (80,3)	15 (19,7)	0,029*
	Sim	96 (100)	0 (0,0)		88 (91,7)	8 (8,3)	
	OR (IC 95%)	-	-	-	1,0	0,37 (0,15-0,93)	0,034*
Desmoplasia	Ausente a leve	39 (100)	0 (0,0)	-	32 (82,1)	7 (17,9)	0,027*
	Moderada a intensa	64 (100)	0 (0,0)		61 (95,3)	3 (4,7)	
	OR (IC 95%)	-	-	-	1,0	0,23 (0,05-0,93)	0,039*

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; *p<0,05

4.2.2.7 Polimorfismo rs1061581 (gene *HSPA1B*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs1061581 do gene *HSPA1B* e as características anatomopatológicas ($p>0,05$), considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178).

4.2.2.8 Polimorfismo rs699947 (gene *VEGFA*)

Foi observada associação significativa entre o polimorfismo rs699947 de *VEGFA* e presença de Invasão sanguínea (Modelos de Alelos e Dominante), de modo que indivíduos portadores do alelo polimórfico A demonstraram apresentar risco aumentado para invasão sanguínea em modelo de regressão logística (Tabela 17).

Tabela 17. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs699947 (gene *VEGFA*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs699947 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		CC	CA	AA	p	C	A	p
Invasão sanguínea	Não	45 (55,6)	28 (34,6)	8 (9,9)	0,06	118 (72,8)	44 (27,2)	0,016*
	Sim	31 (37,3)	38 (45,8)	14 (16,9)		100 (60,2)	66 (39,8)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,97 (1,01-3,85) ^a	2,54 (0,95-6,78) ^b		1,0	1,77 (1,11-2,81)	0,016*

Continuação da Tabela 17

Características	Categorias	Polimorfismo rs699947 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		CC+CA	AA	p	CC	CA+AA	p
Invasão sanguínea	Não	73 (90,1)	8 (9,9)	0,189	45 (55,6)	36 (44,4)	0,019*
	Sim	69 (83,1)	14 (16,9)		31 (37,3)	52 (62,7)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,85 (0,73-4,69)	0,194	1,0	2,10 (1,12-3,92)	0,020*

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,047* (genótipo CA em relação ao CC); ^bp=0,063 (genótipo AA em relação ao CC); *p<0,05

4.2.2.9 Polimorfismo rs833061 (gene *VEGFA*)

Observamos que o alelo C do polimorfismo rs833061 do gene *VEGFA* foi associado a tumores com tamanho maior que 5 cm e maior presença de invasão sanguínea (Modelos de Alelos e Dominante), conferindo risco para ambas as variáveis em modelo de regressão logística (Tabela 18).

Tabela 18. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs833061 (gene *VEGFA*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs833061 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		TT	TC	CC	p	T	C	p
Tamanho do tumor	até 5 cm	45 (47,9)	37 (39,4)	12 (12,8)	0,100	127 (67,6)	61 (32,4)	0,043*
	> 5 cm	27 (32,1)	42 (50,0)	15 (17,9)		96 (57,1)	72 (42,9)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,9 (0,9-3,6) ^a	2,08 (0,9-5,1) ^c		1,0	1,56 (1,0-2,4)	0,043*
Invasão sanguínea	Não	40 (49,4)	31 (38,3)	10 (12,3)	0,120	111 (68,5)	51 (31,5)	0,045*
	Sim	28 (33,7)	40 (48,2)	15 (18,1)		96 (57,8)	70 (42,2)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,84 (0,94-3,61) ^b	2,14 (0,84-5,46) ^d		1,0	1,59 (1,01-2,50)	0,045*

Continuação da Tabela 18

Características	Categorias	Polimorfismo rs833061 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		TT+TC	CC	p	TT	TC+CC	p
Tamanho do tumor	até 5 cm	82 (87,2)	12 (12,8)	0,345	45 (47,9)	49 (52,1)	0,033*
	> 5 cm	69 (82,1)	15 (17,9)		27 (32,1)	57 (67,9)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,49 (0,7-3,4)	0,346	1,0	1,94 (1,1-3,6)	0,034*
Invasão sanguínea	Não	71 (87,7)	10 (12,3)	0,308	40 (49,4)	41 (50,6)	0,042*
	Sim	68 (81,9)	15 (18,1)		28 (33,7)	55 (66,3)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,57 (0,66-3,73)	0,31	1,0	1,92 (1,02-3,60)	0,043*

N: número de indivíduos; DP: desvio-padrão; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%;

^ap=0,06 e ^bp=0,075 (genótipo TC em relação ao TT); ^cp=0,11 e ^dp=0,11 (genótipo CC em relação ao TT);

*p<0,05

4.2.2.10 Polimorfismo rs2010963 (gene *VEGFA*)

Foram observadas associações significativas entre o polimorfismo rs2010963 de *VEGFA* e presença de Metástase Linfonodal (Modelo Recessivo) e Invasão para outros órgãos (Modelos de Alelos e Recessivo), sendo que indivíduos com duas cópias do alelo C (Modelo Recessivo) apresentaram risco aumentado em apresentar invasão para outros órgãos em modelo de regressão logística (Tabela 19).

Tabela 19. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2010963 (gene *VEGFA*) e o cálculo do Odds Ratio para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs2010963 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos			Modelos de Alelos			
		GG	GC	CC		G	C	p
Metástase linfonodal	Não	14 (35,9)	23 (59,0)	2 (5,1)	0,07	51 (65,4)	27 (34,6)	0,44
	Sim	54 (39,4)	58 (42,3)	25 (18,2)		166 (60,6)	108 (39,4)	
		OR (IC 95%)	1,0	0,65 (0,31-1,40) ^a	3,24 (0,68-15,36) ^c		1,0	1,23 (0,73-2,08)
Invasão para outros órgãos	Não	67 (39,2)	80 (46,8)	24 (14,0)	0,09	214 (62,6)	128 (37,4)	0,041*
	Sim	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (50,0)		4 (33,3)	8 (66,7)	
		OR (IC 95%)	1,0	1,68 (0,15-18,88) ^b	8,38 (0,83-84,43) ^d		1,0	3,34 (0,99-11,3)

Continuação da Tabela 19

Características	Categorias	Polimorfismo rs2010963 (gene VEGFA) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		GG+GC	CC	p	GG	GC+CC	p
Metástase linfonodal	Não	37 (94,9)	2 (5,1)	0,045*	14 (35,9)	25 (64,1)	0,69
	Sim	112 (81,8)	25 (18,2)		54 (39,4)	83 (60,6)	
	OR (IC 95%)	1,0	4,13 (0,93-18,28)	0,062	1,0	0,86 (0,41-1,80)	0,69
Invasão para outros órgãos	Não	147 (86,0)	24 (14,0)	0,046*	67 (39,2)	104 (60,8)	0,27
	Sim	3 (50,0)	3 (50,0)		1 (16,7)	5 (83,3)	
	OR (IC 95%)	1,0	6,13 (1,17-32,13)	0,032*	1,0	3,22 (0,37-28,18)	0,29

N: número de indivíduos; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,27 e ^bp=0,68 (genótipo GC em relação ao GG); ^cp=0,14 e ^dp=0,07 (genótipo CC em relação ao GG); *p<0,05

4.2.2.11 Polimorfismo rs3025039 (gene VEGFA)

O polimorfismo rs3025039 de VEGFA foi associado a uma menor profundidade de invasão (t1+t2) e estadiamento mais precoce (I+II) (Modelos de Genótipos e Recessivo), de modo que indivíduos homozigotos para o alelo T apresentaram proteção para essas variáveis em modelo de regressão logística (Tabela 20).

Tabela 20. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs3025039 (gene VEGFA) e o cálculo do Odds Ratio para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs3025039 (gene VEGFA) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		CC	CT	TT	p	C	T	p
Profundidade de invasão	t1+t2	23 (63,9)	9 (25,0)	4 (11,1)	0,031*	55 (76,4)	17 (23,6)	0,055
	t3+t4	102 (72,9)	36 (25,7)	2 (1,4)		240 (85,7)	40 (14,3)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,90 (0,38-2,13) ^a	0,11 (0,02-0,65) ^c		1,0	0,54 (0,29-1,02)	0,055
Estadiamento	I+II	39 (73,6)	9 (17,0)	5 (9,4)	0,009*	87 (82,1)	19 (17,9)	0,520
	III+IV	86 (70,5)	35 (28,7)	1 (0,8)		207 (84,8)	37 (15,2)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,76 (0,77-4,02) ^b	0,09 (0,01-0,80) ^d		1,0	0,82 (0,45-1,50)	0,520

Continuação da Tabela 20

Características	Categorias	Polimorfismo rs3025039 (gene VEGFA) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		CC+CT	TT	p	CC	CT+TT	p
Profundidade de invasão	t1+t2	32 (88,9)	4 (11,1)	0,017*	23 (63,9)	13 (36,1)	0,290
	t3+t4	138 (98,6)	2 (1,4)		102 (72,9)	38 (27,1)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,12 (0,02-0,66)	0,015*	1,0	0,66 (0,30-1,43)	0,292
Estadiamento	I+II	48 (90,6)	5 (9,4)	0,010*	39 (73,6)	14 (26,4)	0,677
	III+IV	121 (99,2)	1 (0,8)		86 (70,5)	36 (29,5)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,08 (0,01-0,70)	0,022*	1,0	1,17 (0,56-2,41)	0,677

N: número de indivíduos; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,814 e ^bp=0,015* (genótipo CT em relação ao CC); ^cp=0,177 e ^dp=0,031* (genótipo TT em relação ao CC); *p<0,05

4.2.2.12 Polimorfismo rs763780 (gene *IL17F*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs763780 de *IL17F* e as características anatomopatológicas ($p>0,05$), considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178).

4.2.2.13 Polimorfismo rs4644 (gene *LGALS3*)

Foi detectada associação significativa entre o alelo A do polimorfismo rs4644 de *LGALS3* e menor Idade ao diagnóstico (Modelos de Alelos e Dominante). Além disso, a presença do alelo A foi associada a um risco aumentado para desmoplasia moderada a intensa (Modelo Dominante) (Tabela 21).

Tabela 21. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs4644 (gene *LGALS3*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178)

Características	Categorias	Polimorfismo rs4644 (gene <i>LGALS3</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		CC	AC	AA	p	C	A	p
Idade ao diagnóstico	Média (DP) anos	63,7 (14,0)	60,2 (12,3)	58,2 (12,1)	0,07	62,71 (13,61)	59,58 (12,19)	0,019*
Desmoplasia	Ausente a leve	25 (64,1)	10 (25,6)	4 (10,3)	0,06	60 (76,9)	18 (23,1)	0,110
	Moderada a intensa	27 (42,2)	31 (48,4)	6 (9,4)		85 (66,4)	43 (33,6)	
	OR (IC 95%)	1,0	2,9 (1,17-7,04) ^a	1,4 (0,35-5,51) ^b		1,0	1,7 (0,89-3,20)	0,110

Continuação da Tabela 21

Características	Categorias	Polimorfismo rs4644 (gene <i>LGALS3</i>) N (%)						
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante			
		CC+AC	AA	p	CC	AC+AA	p	
Idade ao diagnóstico	Média (DP) anos	62,2 (13,4)	58,2 (12,1)	0,18	63,7 (14,1)	59,8 (12,3)	0,025*	
Desmoplasia	Ausente a leve	35 (89,7)	4 (10,3)	0,88	25 (64,1)	14 (35,9)	0,031*	
	Moderada a intensa	58 (90,6)	6 (9,4)		27 (42,2)	37 (57,8)		
	OR (IC 95%)	1,0	0,91 (0,24-3,43)		1,0	2,45 (1,08-5,56)	0,033*	

N: número de indivíduos; DP: Desvio Padrão; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,021* (genótipo AC em relação ao CC); ^bp=0,64 (genótipo AA em relação ao CC); *p<0,05

4.2.2.14 Polimorfismo rs6917 (gene *PHB*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs6917 de *PHB* e as características anatomopatológicas ($p>0,05$), considerando a amostra total de casos com câncer gástrico ($N=178$).

4.2.2.15 Polimorfismo rs1042522 (gene *TP53*)

O alelo polimórfico C (Pro) rs1042522 de *TP53* foi associado a uma menor idade ao diagnóstico (Modelo de Alelos). Além disso, esse mesmo alelo conferiu risco aumentado em apresentar desmoplasia moderada a intensa (Modelo de Alelos e Dominante) e subtipo histológico difuso (Modelo de Alelo e Recessivo) (Tabela 22).

Tabela 22. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs1042522 (gene *TP53*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos com câncer gástrico ($N=178$)

Características	Categorias	Polimorfismo rs1042522 (gene <i>TP53</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		GG	GC	CC	p	G	C	p
Idade ao diagnóstico	Média (DP) anos	64,1 (12,8)	61,5 (14,2)	58,2 (10,6)	0,114	62,96 (13,42)	60,13 (12,90)	0,044*
Desmoplasia	Ausente à leve	18 (46,2)	17 (43,6)	4 (10,3)	0,061	53 (67,9)	25 (32,1)	0,021*
	Moderada à intensa	16 (25,0)	34 (53,1)	14 (21,9)		66 (51,6)	62 (48,4)	
	OR (IC 95%)	1,0	2,3 (0,9-5,5) ^a	3,9 (1,1-14,4) ^c		1,0	2,0 (1,1-3,6)	0,022*
Subtipo histológico	Intestinal	24 (40,7)	30 (50,8)	5 (8,5)	0,062	78 (66,1)	40 (33,9)	0,026*
	Difuso	32 (28,6)	56 (50,0)	24 (21,4)		120 (53,6)	104 (46,4)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,4 (0,7-2,8) ^b	3,6 (1,2-10,8) ^d		1,0	1,7 (1,1-2,7)	0,026*

Continuação da Tabela 22

Características	Categorias	Polimorfismo rs1042522 (gene <i>TP53</i>) N (%)						
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante			p
		GG+GC	CC	p	GG	GC+CC	p	
Idade ao diagnóstico	Média (DP) anos	62,5 (13,7)	58,2 (10,6)	0,070	64,1 (12,8)	60,6 (13,4)	0,124	
Desmoplasia	Ausente à leve	35 (89,7)	4 (10,3)	0,130	18 (46,2)	21 (53,8)	0,027*	
	Moderada à intensa	0,781	0,219		16 (25,0)	48 (75,0)		
	OR (IC 95%)	1,0	2,5 (0,7-8,1)	0,140	1,0	2,6 (1,1-5,6)	0,029*	
Subtipo histológico	Intestinal	54 (91,5)	5 (8,5)	0,032*	24 (40,7)	35 (59,3)	0,11	
	Difuso	88 (78,6)	24 (21,4)		32 (28,6)	80 (71,4)		
	OR (IC 95%)	1,0	2,9 (1,1-8,2)	0,038*	1,00	1,7 (0,9-3,3)	0,11	

N: número de indivíduos; DP: Desvio Padrão; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,74 e ^bp=0,34 (genótipo GC em relação ao GG); ^cp=0,039* e ^dp=0,022* (genótipo CC em relação ao GG); *p<0,05

4.2.3 Associação entre os polimorfismos individuais e as características anatomopatológicas do câncer gástrico, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

4.2.3.1 Polimorfismo rs689466 (gene *COX-2*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs689466 de *COX-2* e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso ($p>0,05$).

4.2.3.2 Polimorfismo rs5275 (gene *COX-2*)

Quando a amostra foi estratificada para o subtipo histológico difuso, foi mantida a associação entre a presença do alelo C do polimorfismo rs5275 de *COX-2* e uma proteção para invasão perineural (Modelos de Genótipo e Dominante), como previamente detectada para a amostra total de casos. Além disso, detectamos uma nova associação entre o alelo C e proteção para desmoplasia que não havia sido observada anteriormente nas análises envolvendo a amostra total de casos (Modelos de Alelos e Dominante) (Tabela 23).

Tabela 23. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs5275 (gene *COX-2*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Características	Categorias	Polimorfismo rs5275 (gene <i>COX-2</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		TT	TC	CC	p	T	C	p
Invasão perineural	Não	10 (26,3)	22 (57,9)	6 (15,8)	0,031*	42 (55,3)	34 (44,7)	0,203
	Sim	34 (47,9)	23 (32,4)	14 (19,7)		91 (64,1)	51 (35,9)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,3 (0,1-0,8) ^a	0,7 (0,2-2,3) ^c		1,0	0,7 (0,4-1,2)	0,204
Desmoplasia	Ausente a leve	3 (16,7)	10 (55,6)	5 (27,8)	0,078	16 (44,4)	20 (55,6)	0,029*
	Moderada a intensa	23 (46,9)	18 (36,7)	8 (16,3)		64 (65,3)	34 (34,7)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,2 (0,1-0,9) ^b	0,2 (0,04-1,1) ^d		1,0	0,4 (0,2-0,9)	0,031*

Continuação da Tabela 23

Características	Categorias	Polimorfismo rs5275 (gene <i>COX-2</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		TT+TC	CC	p	TT	TC+CC	p
Invasão perineural	Não	32 (84,2)	6 (15,8)	0,61	10 (26,3)	28 (73,7)	0,029*
	Sim	0,803	0,197		34 (47,9)	37 (52,1)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,3 (0,5-3,7)	0,61	1,0	0,4 (0,2-0,9)	0,031*
Desmoplasia	Ausente a leve	13 (72,2)	5 (27,8)	0,29	3 (16,7)	15 (83,3)	0,024*
	Moderada a intensa	41 (83,7)	8 (16,3)		23 (46,9)	26 (53,1)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,5 (0,1-1,8)	0,30	1,0	0,2 (0,06-0,9)	0,032*

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,012* ^bp=0,047* (genótipo TC em relação ao TT); ^cp=0,535 e ^dp=0,061 (genótipo CC em relação ao TT)

4.2.3.3 Polimorfismo rs1052133 (gene *OGGI*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs1052133 de *OGGI* e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso (p>0,05).

4.2.3.4 Polimorfismo rs909253 (gene *TNFB*)

Quando estratificado para o subtipo histológico difuso, o polimorfismo rs909253 do gene *TNFB* passou a apresentar associações que não haviam sido detectadas quando avaliamos a amostral total de casos.

A presença do alelo G foi associada a uma predominância de infiltrado inflamatório variando de moderado a intenso (Modelo Dominante), predizendo risco para essa variável em modelo de regressão logística. Além disso, também foi associado à proteção para presença de metástase linfonodal (Modelo de Alelos) e metástase à distância (Modelos de Genótipos e Dominante) (Tabela 24)

Tabela 24. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs909253 (gene *TNFB*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Características	Categorias	Polimorfismo rs909253 (gene <i>TNFB</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		AA	AG	GG	p	A	G	p
Infiltrado inflamatório	Ausente a leve	19 (55,9)	10 (29,4)	5 (14,7)	0,097	48 (70,6)	20 (29,4)	0,068
	Moderado a intenso	9 (30,0)	15 (50,0)	6 (20,0)		33 (55,0)	27 (45,0)	
	OR (IC 95%)	1,0	3,2 (1,0-9,7) ^a	2,5 (0,6-10,6) ^d		1,0	1,9 (0,9-4,1)	0,069
Metástase linfonodal	Não	5 (29,4)	7 (41,2)	5 (29,4)	0,138	17 (50,0)	17 (50,0)	0,035*
	Sim	47 (50,0)	35 (37,2)	12 (12,8)		129 (68,6)	59 (31,4)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,5 (0,2-1,8) ^b	0,26 (0,06-1,0) ^c		1,0	0,46 (0,2-0,9)	0,038*
Metástase à distância	Não	39 (41,5)	40 (42,6)	15 (16,0)	0,029*	118 (62,8)	70 (37,2)	0,083
	Sim	13 (72,2)	2 (11,1)	3 (16,7)		28 (77,8)	8 (22,2)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,2 (0,04-0,9) ^c	0,75 (0,2-3,0) ^f		1,0	0,48 (0,2-1,1)	0,088

Continuação da Tabela 24

Características	Categorias	Polimorfismo rs909253 (gene <i>TNFB</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		AA+AG	GG	p	AA	AG+GG	p
Infiltrado inflamatório	Ausente a leve	29 (85,3)	5 (14,7)	0,58	19 (55,9)	15 (44,1)	0,037*
	Moderado a intenso	24 (80,0)	6 (20,0)		9 (30,0)	21 (70,0)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,45 (0,4-5,3)		1,0	2,96 (1,1-8,3)	0,040*
Metástase linfonodal	Não	12 (70,6)	5 (29,4)	0,08	5 (29,4)	12 (70,6)	0,12
	Sim	82 (87,2)	12 (12,8)		47 (50,0)	47 (50,0)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,35 (0,11-1,17)		1,0	0,42 (0,14-1,28)	0,125
Metástase à distância	Não	79 (84,0)	15 (16,0)	0,94	39 (41,5)	55 (58,5)	0,017*
	Sim	15 (83,3)	3 (16,7)		13 (72,2)	5 (27,8)	
	OR (IC 95%)	1,0	1,23 (0,31-4,85)		1,0	0,35 (0,11-1,07)	0,066

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,045*, ^bp=0,314 e ^cp=0,039* (genótipo AG em relação ao AA); ^dp=0,202, ^ep=0,055 e ^fp=0,682 (genótipo GG em relação ao AA)

4.2.3.5 Polimorfismo rs1800629 (gene *TNFA*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs1800629 de *TNFA* e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso (p>0,05).

4.2.3.6 Polimorfismo rs2227956 (gene *HSPA1L*)

Foi observado que a associação entre o polimorfismo rs2227956 de *HSPA1L* e a ausência de invasão perineural observada inicialmente na amostra total de casos, foi

mantida quando estratificamos a amostra somente para os casos com subtipo histológico difuso (N=112; Modelos de Alelos e Dominante). O alelo C foi capaz de prever proteção para invasão perineural (Tabela 25).

Tabela 25. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2227956 (gene *HSPAIL*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Características	Categorias	Polimorfismo rs2227956 (gene <i>HSPAIL</i>) N (%)						
		Modelo Genótipos				Modelo Alelos		
		TT	TC	CC	p	T	C	p
Invasão perineural	Não	30 (78,9)	7 (18,4)	1 (2,6)	0,06	67 (88,2)	9 (11,8)	0,017*
	Sim	66 (93,0)	5 (7,0)	0 (0,0)		137 (96,5)	5 (3,5)	
	OR (IC 95%)	1,0	0,3 (0,1-1,1)	-	0,07	1,0	0,3 (0,1-0,8)	0,024*

Continuação da Tabela 25

Características	Categorias	Polimorfismo rs2227956 (gene <i>HSPAIL</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		TT+TC	CC	p	TT	TC+CC	p
Invasão perineural	Não	37 (97,4)	1 (2,6)	0,17	30 (78,9)	8 (21,1)	0,032*
	Sim	71 (100,0)	0 (0,0)		66 (93,0)	5 (7,0)	
	OR (IC 95%)	-	-	-	1,0	0,3 (0,1-0,9)	0,039*

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; *p<0,05

4.2.3.7 Polimorfismo rs1061581 (gene *HSPA1B*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs1061581 de *HSPA1B* e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso (p>0,05).

4.2.3.8 Polimorfismo rs699947 (gene *VEGFA*)

A associação entre o polimorfismo rs699947 do gene *VEGFA* e a presença de invasão sanguínea observada inicialmente na amostra total de casos, foi mantida quando estratificamos a amostra somente para os casos com subtipo histológico difuso (N=112; Modelos de Genótipos, Alelos e Dominante), demonstrando que indivíduos portadores do alelo A apresentaram maior risco para invasão sanguínea (Tabela 26).

Tabela 26. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs699947 (gene *VEGFA*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Características	Categorias	Polimorfismo rs699967 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		CC	CA	AA	p	C	A	p
Invasão sanguínea	Não	26 (59,1)	15 (34,1)	3 (6,8)	0,034*	67 (76,1)	21 (23,9)	0,007*
	Sim	20 (35,1)	26 (45,8)	11 (19,3)		66 (57,9)	48 (42,1)	
	OR (IC 95%)	1,0	2,2 (0,9-5,3) ^a	4,77 (1,2-19,4) ^b		1,0	2,3 (1,3-4,3)	0,007*

Continuação da Tabela 26

Características	Categorias	Polimorfismo rs699967 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		CC+CA	AA	p	CC	CA+AA	p
Invasão sanguínea	Não	41 (93,2)	3 (6,8)	0,072	26 (59,1)	18 (40,9)	0,016*
	Sim	46 (80,7)	11 (19,3)		20 (35,1)	37 (64,9)	
	OR (IC 95%)	1,0	3,2 (0,9-12,5)	0,084	1,0	2,7 (1,2-6,0)	0,017*

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,065 (genótipo CA em relação ao CC); ^bp=0,029* (genótipo AA em relação ao CC); *p<0,05

4.2.3.9 Polimorfismo rs833061 (gene *VEGFA*)

A associação entre o polimorfismo rs833061 do gene *VEGFA* e a presença de invasão sanguínea observada inicialmente na amostra total de casos, foi mantida quando estratificamos a amostra somente para os casos com subtipo histológico difuso (N=112; Modelos de Alelos e Dominante), demonstrando que indivíduos portadores do alelo C apresentaram maior risco para invasão sanguínea (Tabela 27).

Tabela 27. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs833061 (gene *VEGFA*) e o cálculo do *Odds Ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Características	Categorias	Polimorfismo rs833061 (gene <i>VEGFA</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		TT	TC	CC	p	T	C	p
Invasão sanguínea	Não	23 (52,3)	17 (38,6)	4 (9,1)	0,08	63 (71,6)	25 (28,4)	0,024*
	Sim	18 (31,6)	28 (49,1)	11 (19,3)		64 (56,1)	50 (43,9)	
	OR (IC 95%)	1,0	2,11 (0,89-4,99) ^a	3,51 (0,96-12,89) ^b		1,0	1,97 (1,09-3,56)	0,015*

Continuação da Tabela 27

Características	Categorias	Polimorfismo rs833061 (gene VEGFA) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		TT+TC	CC	p	TT	TC+CC	p
Invasão sanguínea	Não	40 (90,9)	4 (9,1)	0,153	23 (52,3)	21 (47,7)	0,036*
	Sim	46 (80,7)	11 (19,3)		18 (31,6)	39 (68,4)	
	OR (IC 95%)	1,0	2,39 (0,71-8,10)	0,160	1,0	2,37 (1,05-5,35)	0,037*

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança de 95%; ^ap=0,091 (genótipo TC em relação ao TT); ^bp=0,058 (genótipo CC em relação ao TT); *p<0,05

4.2.3.10 Polimorfismo rs2010963 (gene VEGFA)

Quando estratificamos a amostra para casos com subtipo histológico difuso, foi mantida a associação inicialmente observada entre o polimorfismo rs2010963 do gene VEGFA e uma maior presença de metástase linfonodal (Modelo Recessivo), porém não foi possível calcular o risco associado ao alelo por meio de modelo de regressão logística, devido à presença de uma categoria com ausência de indivíduos (Tabela 28).

Tabela 28. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs2010963 (gene VEGFA) nos diferentes modelos genéticos, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Características	Categorias	Polimorfismo rs2010963 (gene VEGFA) N (%)						
		Modelo de Genótipos				Modelo de Alelos		
		GG	GC	CC	p	G	C	p
Metástase linfonodal	Não	7 (43,8)	9 (56,3)	0 (0,0)	0,12	16 (100,0)	0 (0,0)	0,205
	Sim	38 (40,4)	37 (39,4)	19 (20,2)		75 (79,8)	19 (20,2)	

Continuação da Tabela 28

Características	Categorias	Polimorfismo rs2010963 (gene VEGFA) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		GG+GC	CC	p	GG	GC+CC	p
Metástase linfonodal	Não	16 (100,0)	0 (0,0)	0,048*	7 (43,8)	9 (56,3)	0,80
	Sim	75 (79,8)	19 (20,2)		38 (40,4)	56 (59,6)	

N: número de indivíduos

4.3.3.11 Polimorfismo rs3025039 (gene VEGFA)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs3025039 de VEGFA e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso (p>0,05).

4.2.3.12 Polimorfismo rs763780 (gene *IL17F*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs763780 de *IL17F* e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso ($p>0,05$).

4.2.3.13 Polimorfismo rs4644 (gene *LGALS3*)

Quando estratificamos a amostra para casos com subtipo histológico difuso, foi mantida a associação inicialmente observada entre o polimorfismo rs4644 do gene *LGALS3* uma menor idade de acometimento da doença (Modelos de Genótipo, Alelos, Recessivo e Dominante; Tabela 29).

Tabela 29. Características anatomopatológicas associadas ao polimorfismo rs4644 (gene *LGALS3*) nos diferentes modelos genéticos, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Características	Categorias	Polimorfismo rs4644 (gene <i>LGALS3</i>) N (%)						
		Modelos de Genótipos				Modelos de Alelos		
		CC	AC	AA	p	C	A	p
Idade ao diagnóstico	média (DP) anos	62,7 (15,5) [§]	58,1 (12,2) [§]	52,11 (13,3) [§]	0,019*	61,2 (14,6)	56,5 (12,6)	0,006*

Continuação da Tabela 29

Características	Categorias	Polimorfismo rs4644 (gene <i>LGALS3</i>) N (%)					
		Modelo Recessivo			Modelo Dominante		
		CC+AC	AA	p	CC	AC+AA	p
Idade ao diagnóstico	média (DP) anos	60,5 (14,2)	52,1 (13,3)	0,046*	62,7 (15,5)	57,2 (12,4)	0,013*

N: número de indivíduos; DP: desvio-padrão; [§]comparação dois a dois realizada por meio de teste de Mann Whitney (CC vs AC com $p=0,039$; CC vs AA com $p=0,028$; AC vs AA com $p=0,109$). Como foram realizados três testes independentes de Mann Whitney dois a dois para detectar quais grupos apresentavam diferença na Idade ao diagnóstico, foi aplicada a correção para múltiplos testes de Bonferroni, em que o nível de significância $\alpha=0,05$ é dividido pelo número de comparações e o novo valor de significância considerado foi de $0,05/3 = 0,016$

4.2.3.14 Polimorfismo rs6917 (gene *PHB*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs6917 de *PHB* e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso ($p>0,05$).

4.2.3.15 Polimorfismo rs1042522 (gene *TP53*)

Não foram observadas associações significantes entre o polimorfismo rs1042522 de *TP53* e as características anatomopatológicas, considerando-se a amostra de casos com subtipo histológico difuso ($p>0,05$).

4.2.4 Associação entre os haplótipos e as características anatomopatológicas do câncer gástrico, na amostra total de casos (N=178)

As associação dos haplótipos com as características anatomopatológicas nos pacientes com câncer gástrico incluíram os polimorfismos dos genes *TNFB*, *TNFA*, *HSPA1L*, *HSPA1B*, *VEGFA* e *IL17F*, localizados no cromossomo 6 e os polimorfismos de *COX-2*, situados no cromossomo 1. O polimorfismo de *IL17F* não seguiu o EHW ($p>0,01$) no grupo de casos e, portanto, foi automaticamente excluído da análise.

Inicialmente foram calculados os valores de D' para verificar quais polimorfismos apresentavam-se em desequilíbrio de ligação na amostra de 178 pacientes com câncer gástrico, selecionados para esse estudo.

Foram considerados em desequilíbrio de ligação os polimorfismos que apresentaram valores de $D'\geq 0,75$. Os haplótipos cujos polimorfismos encontraram-se em desequilíbrio de ligação selecionados para as análises foram: rs909253 e rs1800629 (*TNFB* e *TNFA*, respectivamente; $D'=0,79$), rs699947, rs833061 e rs2010963 (*VEGFA*; $D'=0,97$) e rs689466 e rs5275 (*COX-2*; $D'=1,0$). Os blocos haplotípicos formados pelos polimorfismos de *TNF* e *VEGFA*, localizados no cromossomo 6, foram didaticamente chamados de blocos 1 e 2, respectivamente (Figura 11A) e o bloco haplotípico formado pelos dois polimorfismos de *COX-2* foi chamado de bloco 3 (Figura 11B).

Figura 11. Representação dos blocos de haplótipos, cujos polimorfismos encontraram-se em desequilíbrio de ligação no grupo de pacientes com câncer gástrico. **(A)** Bloco 1 (polimorfismos de *TNFB*), bloco 2 (polimorfismos de *VEGFA*) e **(B)** Bloco 3 (polimorfismos de *COX-2*). Entre parênteses está representado o tamanho em kilobases (kb) de cada bloco. Os valores de D' estão apresentados em porcentagem dentro dos losangos e representam o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos (quanto maior o valor de D' , maior é a intensidade da cor vermelha e maior é o desequilíbrio de ligação). Adaptação da figura gerada pelo *software* Haploview 4.2

As frequências detectadas para cada haplótipo, em nossa amostra de casos com câncer gástrico, estão representadas na Tabela 30.

Tabela 30. Frequências observadas para cada haplótipo, cujos polimorfismos apresentaram desequilíbrio de ligação, na amostra total de pacientes com câncer gástrico

Blocos	Polimorfismos (Genes)	Haplótipos	freq (%)
1	rs909253 e rs1800629 (<i>TNFB/TNFA</i>)	AG	64,2
		GG	22,6
		GA	11,4
		AA	1,8
2	rs699947, rs833061 e rs2010963 (<i>VEGFA</i>)	CTC	38,2
		ACG	33,6
		CTG	24,5
		CCG	3,4
		CCC	3,2
3	rs689466 e rs5275 (<i>COX-2</i>)	AT	45,2
		AC	37,4
		GT	17,4

freq: frequência

Dentre as características anatomopatológicas avaliadas, foram encontradas associações significativas entre o haplótipo GG (bloco 1) e presença de invasão perineural ($p=0,044$); entre o haplótipo ACG (bloco 2) e presença de invasão sanguínea ($p=0,012$); entre o haplótipo CTC (bloco 2) e presença de invasão para outros órgãos ($p=0,040$); e entre o haplótipo GT (bloco 3) e o subtipo histológico intestinal de Lauren ($p=0,038$), representados na Tabela 31.

Não foram encontradas associações significativas entre os haplótipos e as seguintes variáveis: idade de acometimento, tamanho do tumor, profundidade de invasão, invasão linfática, infiltrado inflamatório, desmoplasia, metástase linfonodal, metástase à distância e estadiamento da doença ($p>0,05$).

Tabela 31. Associações significativas observadas entre os haplótipos formados pelos polimorfismos que se encontraram em desequilíbrio de ligação, e as características anatomopatológicas na amostra total de casos com câncer gástrico

Blocos	Polimorfismos	Genes	Anatomopatológico	Haplótipos	P/A (%)	χ^2	p
1	rs909253 e rs1800629	<i>TNFB/TNFA</i>	Invasão perineural	GG	26,0/17,0	4,05	0,044*
2	rs699947, rs833061 e rs2010963	<i>VEGFA</i>	Invasão sanguínea	ACG	39,8/26,7	6,26	0,012*
			Invasão para outros órgãos	CTC	66,7/37,4	4,21	0,040*
3	rs689466 e rs5275	<i>COX-2</i>	Subtipo Intestinal	GT	23,7/14,7	4,27	0,038*

P/A: Presença/Ausência; * $p<0,05$; Software PLINK

Os resultados das associações dos haplótipos com as características anatomopatológicas foram apresentados somente para as análises que incluíram a amostra total de casos (N=178). Não serão apresentados os resultados estratificados por subtipo histológico (detalhes na Seção de Discussão).

4.2.5 RESULTADOS PARA OS MARCADORES DE PROGRESSÃO DO CÂNCER GÁSTRICO

As Tabelas 32 a 34 resumem os resultados encontrados nesse estudo para as análises que buscaram marcadores genéticos de progressão do câncer gástrico, tanto considerando a amostra total ou estratificada para os casos com subtipo histológico difuso.

Nas análises que investigaram os polimorfismos individualmente, identificamos que rs689466 (*COX-2*); rs1052133 (*OGGI*); rs699947, rs833061e rs2010963 (*VEGFA*); rs4644 (*LGALS3*) e rs1042522 (*TP53*) foram significativamente associados a variáveis anatomopatológicas de pior progressão da doença (Tabela 32). Já os polimorfismos rs5275 (*COX-2*); rs2227956 (*HSPAIL*) e rs3025039 (*VEGFA*) foram associados a variáveis anatomopatológicas de melhor progressão da doença (Tabela 33), para as análises considerando a amostra total de casos (N=178). Também foi observado que o polimorfismo rs909253 (*TNFB*) foi capaz de prever uma melhor progressão da doença somente quando considerado os casos com subtipo difuso (N=112).

Nas análises de associação com os haplótipos, identificamos as seguintes associações: haplótipo GG (*TNFB/TNFA*) e invasão perineural; haplótipo ACG (*VEGFA*) e invasão sanguínea; haplótipo CTC (*VEGFA*) e invasão para outros órgãos; haplótipo GT (rs689466 e rs5275 do gene *COX-2*) e subtipo histológico intestinal (Tabela 34).

Tabela 32. Polimorfismos associados a variáveis anatomopatológicas de pior progressão do câncer gástrico e modelos genéticos nos quais as associações foram detectadas, separadamente para a amostra total (N=178) e para os casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Polimorfismo (gene)	Casuística	Pior Progressão (RISCO)	Modelo Genético	Alelo associado
rs689466 (<i>COX-2</i>)	Amostra Total	Invasão linfática Subtipo histológico intestinal	Genótipo Alelos	Alelo G (<i>upstream</i>)
rs1052133 (<i>OGGI</i>)	Amostra Total	Invasão perineural e desmoplasia	Recessivo	Alelo G (Cis) <i>missense</i> (Ser→Cis)
rs699947 (<i>VEGFA</i>)	Amostra Total	Invasão sanguínea	Alelos e Dominante	Alelo A (<i>upstream</i>)
	Subtipo Difuso	Invasão sanguínea	Genótipo, Alelos e Dominante	
rs833061 (<i>VEGFA</i>)	Amostra Total	Invasão sanguínea e tamanho do tumor	Alelos e Dominante	Alelo C (<i>upstream</i>)
	Subtipo Difuso	Invasão sanguínea	Alelos e Dominante	
rs2010963 (<i>VEGFA</i>)	Amostra Total	Invasão para outros órgãos Metástase linfonodal	Alelos e Recessivo Recessivo	Alelo C (5'-UTR)
	Subtipo Difuso	Metástase linfonodal	Recessivo	
rs4644 (<i>LGALS3</i>)	Amostra Total	Idade ao diagnóstico Desmoplasia	Alelos e Dominante Dominante	Alelo A (His) <i>missense</i> (Pro→His)
	Subtipo Difuso	Idade ao diagnóstico	Genótipos, Alelos, Recessivo e Dominante	
rs1042522 (<i>TP53</i>)	Amostra Total	Idade ao diagnóstico	Alelos	Alelo C (Pro) <i>missense</i> (Arg→Pro)
		Desmoplasia Subtipo histológico difuso	Alelos e Dominante Alelos e Recessivo	

UTR: *untranslated region*

Tabela 33. Polimorfismos associados a variáveis anatomopatológicas de melhor progressão do câncer gástrico e modelos genéticos nos quais as associações foram detectadas, separadamente para a amostra total (N=178) e para os casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Polimorfismo (gene)	Casuística	Melhor Progressão (PROTEÇÃO)	Modelo Genético	Alelo associado
rs5275 (<i>COX-2</i>)	Amostra total	Profundidade de invasão e invasão perineural	Dominante	Alelo C (3'-UTR)
	Subtipo Difuso	Invasão perineural Desmoplasia	Genótipo e Dominante Alelos e Dominante	
rs909253 (<i>TNFB</i>)	Subtipo Difuso	Infiltrado inflamatório	Dominante	Alelo G (intron)
		Metástase à distância Metástase linfonodal	Genótipo e Dominante Alelos	
rs2227956 (<i>HSPAIL</i>)	Amostra total	Desmoplasia Invasão perineural	Genótipo, Alelos e Dominante Alelos e Dominante	Alelo C
	Subtipo Difuso	Invasão perineural	Alelos e Dominante	
rs3025039 (<i>VEGFA</i>)	Amostra total	Profundidade de invasão e estadiamento	Genótipos e Recessivo	Alelo C (3'-UTR)

UTR: *untranslated region*

Tabela 34. Haplótipos associados a variáveis anatomopatológicas de pior progressão do câncer gástrico na amostra total de casos (N=178)

Polimorfismo (gene)	Casuística	Pior Progressão (RISCO)	Haplótipo (%) [§]
rs689466 e rs5275 (<i>COX-2</i>) -1195G>A (<i>upstream</i>) e +8437T>C (3'-UTR)	Amostra total	Subtipo histológico intestinal	Haplótipo GT (17,4%)
rs909253 e rs1800629 (<i>TNFB/TNFA</i>) +252G>A (intron) e -308G>A (<i>upstream</i>)	Amostra total	Invasão perineural	Haplótipo GG (22,6%)
rs699947, rs833061 e rs2010963 (<i>VEGFA</i>) -2578C>A (<i>upstream</i>), -1498T>C (<i>upstream</i>) e +405G>C (5'-UTR)	Amostra total	Invasão sanguínea Invasão para outros órgãos	Haplótipo ACG (33,6%) Haplótipo CTC (38,2%)

UTR: *untranslated region*; [§] frequência na qual o haplótipo foi observado na amostra total desse estudo

4.3 PROGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO (Sobrevida Global e Livre de Doença)

4.3.1 Descrição da Sobrevida Global e Livre de Doença, na amostra total de casos (N=178)

O estudo incluiu 178 pacientes com câncer gástrico que foram acompanhados a partir da data de diagnóstico inicial (primeiro caso diagnosticado em junho de 2001) até 31 de março de 2016, sendo o tempo total de seguimento de 172,5 meses. Ao final do período de seguimento foram registradas 22 perdas de seguimento (12,4%), das quais não foram encontradas as respectivas declarações de óbito. Pacientes vivos ao final do período ou que tiveram perda de seguimento foram considerados como eventos censurados nas análises de sobrevida.

Ao final do período de seguimento total, as sobrevidas global e livre de doença foram respectivamente de 39,3% e 48,5% (Figura 12). Da amostra total, 99 pacientes (55,6%) foram a óbito (incluindo óbito por quaisquer causas) e 79 pacientes (44,4%) apresentaram recorrência ou morte específica pela doença. A média (DP) de tempo de sobrevida global foi de 82,27 (5,84) meses (variando de 0 a 86,1 meses) e de sobrevida livre de doença de 94,64 (6,27) meses (variando de 2,3 a 125,6 meses).

Figura 12. Curvas de sobrevida (A) global e (B) livre de doença dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico em nosso estudo (N=178), obtidas pelo método de Kaplan-Meier

Considerando-se cinco anos de seguimento (60 meses), observamos que 96 pacientes foram a óbito (incluindo todas as causas de óbito) e 78 apresentaram recorrência ou morte específica pela doença. Nesse período, as sobrevidas global e livre de doença foram respectivamente de 42,3% e 50,2%. Considerando somente os casos diagnosticados em estágio III+IV, observamos sobrevida global em cinco anos de 29,5%, contra 84,6% observado em pacientes estágio I+II. Para a sobrevida livre de doença em cinco anos, observamos 36,0% e 70,2% para pacientes diagnosticados em estágio III+IV e I+II, respectivamente.

Visto que as variáveis anatomopatológicas podem atuar como potenciais fatores que influenciam no prognóstico do câncer gástrico, investigamos a associação entre esses fatores e as curvas de sobrevidas global e livre de doença (representadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente) utilizando o método de Kaplan-Meier. Com exceção de infiltrado inflamatório e desmoplasia, o teste de log-rank detectou associações significativas entre as demais variáveis anatomopatológicas do estudo e as sobrevidas global e livre de doença ($p < 0,05$).

Figura 13. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global considerando-se a amostra total de pacientes diagnosticados com câncer gástrico nesse estudo (N=178), segundo as características anatomopatológicas. A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento; L) Subtipo Histológico; valor de p baseado no teste de log-rank

Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença considerando-se a amostra total de pacientes diagnosticados com câncer gástrico nesse estudo (N=178). A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento; L) Subtipo Histológico; valor de p baseado no teste de log-rank

As análises univariadas demonstraram que as seguintes categorias foram independentemente associadas a menores tempos de sobrevida global e livre de doença: tumores maiores que 5 cm, maior profundidade de invasão (t3+t4), presença de invasão perineural, sanguínea e linfática, invasão para outros órgãos, presença de metástase linfonodal e à distância, estadiamento mais tardio (III+IV) e subtipo histológico difuso ($p<0,05$). A Tabela 35 apresenta os valores de *hazard ratio* (HR, do inglês razão de riscos) e IC 95% para as variáveis avaliadas. Desta forma, todas essas variáveis anatomopatológicas foram incluídas como covariáveis de ajuste nos modelos multivariados de regressão de Cox que investigaram o valor prognóstico dos polimorfismos analisados nesse estudo.

As variáveis sociodemográficas do estudo (gênero, idade, etnia, escolaridade, tabagismo e etilismo) não foram independentemente associadas à sobrevida global e livre de doença (dados não mostrados) e, portanto, não foram incluídas como covariáveis de ajuste nas análises multivariadas.

Tabela 35. Sobrevida global e livre de doença segundo as características anatomopatológicas no câncer gástrico, considerando a amostra total de casos (N=178)

Características anatomopatológicas	Categorias	Sobrevida Global						Sobrevida Livre de Doença					
		N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p	N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p
Tamanho do tumor	≤ 5 cm	94	46	95,1	0,017*	1 (Ref)	0,018*	94	31	115,3	0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	> 5 cm	84	53	59,8		1,6 (1,1-2,4)		84	48	64,2		2,8 (1,7-4,6)	
Profundidade de invasão (pT)	t1+t2	36	14	112,3	0,007*	1 (Ref)	0,008*	36	7	137,3	0,001*	1 (Ref)	0,003*
	t3+t4	141	84	74,0		2,1 (1,2-3,8)		141	71	83,2		3,6 (1,5-8,3)	
Invasão perineural	não	76	32	104,4	<0,001*	1 (Ref)	0,001*	76	27	111,7	0,006*	1 (Ref)	0,006*
	sim	96	64	63,4		2,1 (1,4-3,2)		96	50	78,3		2,0 (1,2-3,3)	
Invasão linfática	não	68	27	110,2	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*	68	17	129,7	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	sim	104	69	58,1		2,4 (1,5-3,8)		104	60	64,7		2,9 (1,6-5,0)	
Invasão sanguínea	não	81	32	109,5	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*	81	24	121,8	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	sim	83	56	56,4		2,4 (1,6-3,8)		83	47	66,5		3,0 (1,7-5,3)	
Infiltrado inflamatório	ausente a leve	50	30	75,1	0,376	1 (Ref)	0,378	50	26	83,3	0,400	1 (Ref)	0,296
	moderado a intenso	51	26	92,5		0,9 (4,7-1,3)		51	22	100,4		0,7 (0,4-1,3)	
Desmoplasia	ausente a leve	39	19	92,4	0,238	1 (Ref)	0,240	39	18	94,1	0,454	1 (Ref)	0,776
	moderada a intensa	64	39	77,3		1,4 (0,8-2,4)		64	33	86,4		1,1 (0,6-2,1)	
Invasão para outros órgãos (pT4b)	não	172	94	83,9	0,012*	1 (Ref)	0,017*	172	75	96,3	0,039*	1 (Ref)	0,316
	sim	6	5	27,1		3,0 (1,2-7,4)		6	4	31,9		2,1 (0,5-8,7)	
Metástase linfonodal	não	40	14	118,4	0,002*	1 (Ref)	0,003*	40	4	153,7	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	sim	137	84	70,3		2,4 (1,3-4,2)		137	74	78,0		6,1 (2,2-17,0)	
Metástase à distância (pM)	não	152	76	92,2	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*	152	56	107,8	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	sim	26	23	19,4		3,9 (2,4-6,3)		26	23	18,5		5,0 (2,8-9,0)	
Estadiamento	I+II	54	18	120,6	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*	54	7	149,1	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	III+IV	123	80	63,1		2,8 (1,7-4,7)		123	71	69,8		5,9 (2,7-13,1)	
Subtipo histológico	Intestinal	59	23	100,0	0,003*	1 (Ref)	0,005*	59	18	109,6	0,008*	1 (Ref)	0,009*
	Difuso	112	74	68,2		2,0 (1,3-3,2)		112	59	81,1		2,0 (1,2-3,4)	

N: número de indivíduos; HR: *Hazard ratio*; IC: Intervalo de Confiança; Ref: referência; *p<0,05

As curvas de sobrevida global e livre de doença estratificadas por genótipos/alelos foram investigadas na amostra total de casos (N=178) para todos os polimorfismos do estudo por meio do método de Kaplan-Meier, nos quatro Modelos Genéticos propostos. Devido ao grande volume de análises realizadas, serão representados somente os resultados para os polimorfismos que apresentaram associações significativas ($p < 0,05$; teste de log-rank).

O polimorfismo rs909253 do gene *TNFB* apresentou diferenças nas curvas de sobrevida global (Modelos de Alelos e Dominante) e livre de doença (Modelos de Genótipos, Alelos e Dominante) (Figura 15), enquanto que o polimorfismo rs4644 do gene *LGALS3* apresentou diferenças somente nas curvas de sobrevida livre de doença (Modelos de Alelos e Dominante) (Figura 16).

Figura 15. Curvas de sobrevida global (A-D) e livre de doença (F-I) estratificadas para os genótipos/alelos do polimorfismo rs909253 do gene *TNFB* considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178), nos Modelos Genéticos de Genótipos (A e F), de Alelos (B e G), Recessivo (C e H) e Dominante (D e I); valor de p calculado pelo teste de log-rank

Figura 16. Curvas de sobrevida global (A-D) e livre de doença (F-I) estratificadas para os genótipos/alelos do polimorfismo rs4644 do gene *LGALS3* considerando-se a amostra total de casos com câncer gástrico (N=178), nos diferentes Modelos Genéticos: (A e F) Genótipos, (B e G) Alelos, (C e H) Recessivo e (D e I) Dominante; valor de p calculado pelo teste de log-rank

Todas as características anatomopatológicas associadas independentemente às curvas de sobrevida global e livre de doença foram incluídas como covariáveis de ajuste nos modelos de regressão de Cox que calcularam os valores de HR e IC 95%. As análises multivariadas demonstraram que o alelo polimórfico G de rs909253 do gene *TNFB* foi associado a um melhor prognóstico ($HR<1$), com maiores tempos de sobrevida global e livre de doença em relação ao alelo A (Tabela 36).

Além disso, indivíduos portadores do alelo A (His) do polimorfismo de *LGALS3* apresentaram menores tempos de sobrevida livre de doença, embora tenham perdido a associação após ajuste para as covariáveis utilizadas nas análises multivariadas (Tabela 36).

Resultados

Tabela 36. Curvas de sobrevida global e livre de doença de acordo com os polimorfismos rs909253 de *TNFB* e rs4644 de *LGALS3* e o cálculo do *Hazard ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra total de casos (N=178)

Polimorfismo (Gene)	Modelo Genético	Genótipos / Alelos	Sobrevida Global						Sobrevida Livre de Doença					
			N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p ^a	N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p ^a
rs909253 (<i>TNFB</i>)	Genótipos	AA	80	49	69,8		1 (Referência)		80	43	75,2		1 (Referência)	
		AG	74	40	85,8	0,065	0,74(0,5-1,2)	0,206	74	27	107,4	0,020*	0,63 (0,4-1,1)	0,093
		GG	23	10	101,8		0,27 (0,1-0,6)	0,003*	23	9	105,5		0,29 (0,1-0,8)	0,011*
	Dominante	AA	80	49	69,8	0,047*	1 (Referência)		80	43	75,2	0,006*	1 (Referência)	
		AG+GG	97	50	91,4		0,31 (0,1-0,7)	0,007*	97	36	108,9		0,53 (0,3-0,9)	0,013*
	Recessivo	AA+AG	154	89	77,9	0,061	1 (Referência)		154	70	91,3	0,160	1 (Referência)	
		GG	23	10	101,8		0,59 (0,4-0,9)	0,022*	23	9	105,5		0,35 (0,1-0,9)	0,028*
	Alelos	alelo A	234	138	75,5	0,015*	1 (Referência)		234	113	86,2	0,006*	1 (Referência)	
		alelo G	120	60	94,9		0,57 (0,4-0,8)	0,002*	120	45	109,8		0,54 (0,4-0,8)	0,003*
rs4644 (<i>LGALS3</i>)	Genótipos	CC	89	49	85,4		1 (Referência)		89	32	109,3		1 (Referência)	
		AC	72	43	71,5	0,371	1,06 (0,7-1,7)	0,816	72	38	77,0	0,058	1,53 (0,9-2,6)	0,121
		AA	17	7	94,7		0,83 (0,4-1,9)	0,673	17	9	77,2		1,73 (0,8-4,0)	0,197
	Dominante	CC	89	49	85,4	0,442	1 (Referência)		89	32	109,3	0,017*	1 (Referência)	
		AC+AA	89	50	76,5		0,81 (0,4-1,9)	0,627	89	47	77,7		1,41 (0,6-3,1)	0,392
	Recessivo	CC+AC	161	92	80,4	0,402	1 (Referência)		161	70	95,8	0,510	1 (Referência)	
		AA	17	7	94,7		1,01 (0,6-1,6)	0,962	17	9	77,2		1,57 (0,9-2,6)	0,084
	Alelos	alelo C	250	141	82,1	0,829	1 (Referência)		250	102	100,6	0,029*	1 (Referência)	
		alelo A	106	57	80,1		0,97 (0,7-1,4)	0,856	106	56	78,2		1,39 (1,0-2,0)	0,084

N: número de indivíduos; HR: *Hazard ratio*; IC: Intervalo de Confiança; ^aajustado para todas as variáveis anatomopatológicas associadas nas análises univariadas; *p<0,05

4.3.3 Descrição da Sobrevida Global e Livre de Doença, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Quando avaliamos somente os casos com subtipo difuso de câncer gástrico (N=112), observamos que esses apresentaram menores valores de sobrevidas global e livre de doença (30,2% e 39,3%, respectivamente; Figura 17) quando comparados à amostra total sem estratificar por subtipo histológico (N=178; Figura 12).

Figura 17. Curvas de sobrevida (A) global e (B) livre de doença dos pacientes diagnosticados com subtipo histológico difuso de câncer gástrico em nosso estudo (N=112), obtidas pelo método de Kaplan-Meier

Dessa amostra, 74 pacientes (66,1%) foram a óbito (incluindo óbito por quaisquer causas) e 59 pacientes (52,7%) apresentaram recorrência ou morte específica pela doença. A média (DP) de tempo de sobrevida global ao final do seguimento foi de 68,2 (6,9) meses (variando de 0 a 86,1 meses) e de sobrevida livre de doença de 81,1 (7,7) meses (variando de 2,3 a 125,6 meses). Considerando-se cinco anos de seguimento, os tempos de sobrevida global e livre de doença foram, respectivamente, de 32,4% e 41,6%.

Além disso, investigamos as variáveis anatomopatológicas independentemente associadas às curvas de sobrevida global e livre de doença, pelo método de Kaplan-Meier (Figura 18 e 19, respectivamente).

Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global, considerando-se a amostra de pacientes com subtipo histológico difuso de câncer gástrico (N=112). A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento; valor de p baseado no teste de log-rank

Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença, considerando-se a amostra de pacientes com subtipo histológico difuso de câncer gástrico (N=112). A) Tamanho do tumor; B) Profundidade de invasão; C) Invasão perineural; D) Invasão linfática; E) Invasão sanguínea; F) Infiltrado inflamatório; G) Desmoplasia; H) Invasão para outros órgãos; I) Metástase linfonodal; J) Metástase à distância; K) Estadiamento; valor de p baseado no teste de log-rank

Para a amostra de casos com subtipo histológico difuso, com exceção de infiltrado inflamatório, desmoplasia e invasão para outros órgãos, as demais variáveis anatomopatológicas foram capazes de predizer pior sobrevida global nas análises univariadas (Tabela 37). Da mesma forma, com exceção de invasão perineural, infiltrado inflamatório, desmoplasia e invasão para outros órgãos, as demais variáveis foram associadas à sobrevida livre de doença nas análises univariadas (Tabela 37). Essas características anatomopatológicas foram utilizadas como covariáveis de ajuste nas análises multivariadas subsequentes.

Resultados

Tabela 37. Sobrevida global e livre de doença segundo as características anatomopatológicas no câncer gástrico, considerando-se somente os casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Variáveis anatomopatológicas	Categorias	Sobrevida Global						Sobrevida Livre de Doença					
		N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p	N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p
Tamanho do tumor	≤ 5 cm	61	35	82,4	0,032*	1 (Ref)	0,034*	61	25	100,7	0,014*	1 (Ref)	0,016*
	> 5 cm	51	39	44,2		1,7 (1,0-2,6)		51	34	50,3		1,9 (1,1-3,2)	
Profundidade de invasão (pT)	t1+t2	20	10	99,1	0,036*	1 (Ref)	0,040*	20	5	128,8	0,006*	1 (Ref)	0,010*
	t3+t4	91	63	61,1		2,0 (1,0-3,9)		91	53	70,2		3,3 (1,3-8,4)	
Invasão perineural	não	38	21	88,8	0,019*	1 (Ref)	0,021*	38	18	96,0	0,120	1 (Ref)	0,123
	sim	71	51	56,2		1,8 (1,1-3,0)		71	39	71,5		1,6 (0,9-1,7)	
Invasão linfática	não	38	18	104,0	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*	38	11	125,9	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	sim	72	54	46,3		2,7 (1,6-4,6)		72	46	53,7		3,9 (2,0-7,5)	
Invasão sanguínea	não	44	23	95,8	0,001*	1 (Ref)	0,001*	44	16	113,9	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	sim	57	42	45,7		2,3 (1,4-3,9)		57	36	53,3		2,9 (1,6-5,3)	
Infiltrado inflamatório	ausente a leve	34	22	72,9	0,820	1 (Ref)	0,820	34	20	77,6	0,734	1 (Ref)	0,734
	moderado a intenso	30	19	74,4		1,1 (0,6-2,0)		30	15	89,3		0,9 (0,5-1,7)	
Desmoplasia	ausente a leve	18	11	78,4	0,495	1 (Ref)	0,496	18	11	79,2	0,947	1 (Ref)	0,947
	moderada a intensa	49	33	68,6		1,3 (0,6-2,5)		49	27	80,6		1,0 (0,5-2,1)	
Invasão para outros órgãos (pT4b)	não	108	71	68,8	0,436	1 (Ref)	0,441	108	56	82,3	0,273	1 (Ref)	0,281
	sim	4	3	37,4		1,6 (0,5-5,0)		4	3	37,3		1,9 (0,6-6,1)	
Metástase linfonodal	não	17	7	110,8	0,022*	1 (Ref)	0,027*	17	3	139,0	0,007*	1 (Ref)	0,013*
	sim	94	66	59,2		2,4 (1,1-5,3)		94	55	70,9		4,3 (1,4-13,9)	
Metástase à distância (pM)	não	94	56	78,4	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*	94	41	95,7	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	sim	18	18	17,4		3,4 (1,9-5,8)		18	18	16,4		4,0 (2,3-7,0)	
Estadiamento	I+II	27	11	111,4	0,001*	1 (Ref)	0,002*	27	4	146,0	<0,001*	1 (Ref)	<0,001*
	III+IV	84	62	52,7		2,8 (1,4-5,3)		84	54	60,5		6,4 (2,3-17,8)	

N: número de indivíduos; HR: Hazard ratio; IC: Intervalo de Confiança; Ref: referência; *p<0,05

4.3.4 Associação entre os polimorfismos individuais e a Sobrevida Global e Livre de Doença do câncer gástrico, na amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Quando estratificamos por subtipo histológico difuso, não observamos novas associações entre os polimorfismos do estudo e as curvas de sobrevida. Verificamos que o polimorfismo rs909253 de *TNFB* mantém as associações anteriormente observadas na amostra total, com sobrevida global (Modelos Dominante e de Alelos) e com a sobrevida livre de doença (todos os Modelos Genéticos; Figura 20). As análises multivariadas demonstraram que o alelo polimórfico atuou como fator de melhor prognóstico ($HR < 1$), com maiores tempos de sobrevidas (Tabela 38). O polimorfismo rs4644 do gene *LGALS3* não manteve a associação anteriormente observada com sobrevida livre de doença na amostra total ($p > 0,05$).

Figura 20. Curvas de sobrevida global (A-D) e livre de doença (F-I) estratificadas para os genótipos/alelos do polimorfismo rs909253 do gene *TNFB*, considerando-se somente os casos com subtipo histológico difuso de câncer gástrico (N=112), nos diferentes Modelos Genéticos: (A e F) Genótipos, (B e G) Alelos, (C e H) Recessivo e (D e I) Dominante; valor de p calculado pelo teste de log-rank

Tabela 38. Curvas de sobrevida global e livre de doença de acordo com o polimorfismo rs909253 de *TNFB* e o cálculo do *Hazard ratio* para cada modelo genético, considerando a amostra de casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Polimorfismo (Gene)	Modelo Genético	Genótipos / Alelos	Sobrevida Global						Sobrevida Livre de Doença					
			N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p	N Casos	N eventos	Média	p log-rank	HR (IC 95%)	p
rs909253 (<i>TNFB</i>)	Genótipos	AA	52	37	54,1		1 (Referência)		52	33	58,9		1 (Referência)	
		AG	42	27	71,8	0,073	0,8 (0,46-1,4)	0,464	42	19	91,6	0,017*	0,7 (0,4-1,3)	0,280
		GG	18	10	90,8		0,32 (0,1-0,8)	0,013*	18	7	105,8		0,3 (0,1-0,8)	0,013*
	Dominante	AA	52	37	54,1	0,049*	1 (Referência)		52	33	58,9	0,008*	1 (Referência)	
		AG+GG	60	37	79,1		0,6 (0,4-1,1)	0,078	60	26	98,7		0,5 (0,3-0,9)	0,041*
	Recessivo	AA+AG	94	64	62,5	0,058	1 (Referência)		94	52	73,9	0,040*	1 (Referência)	
		GG	18	10	90,8		0,35 (0,1-0,8)	0,018*	18	7	105,8		0,3 (0,1-0,9)	0,025*
	Alelos	alelo A	146	101	59,7	0,012*	1 (Referência)		146	85	68,8	0,002*	1 (Referência)	
		alelo G	78	47	83,2		0,6 (0,4-0,9)	0,007*	78	33	102,5		0,7 (0,4-0,9)	0,042*

N: número de indivíduos; HR: *Hazard ratio*; IC: Intervalo de Confiança; ^aajustado para todas as variáveis anatomopatológicas associadas nas análises univariadas; *p<0,05

4.3.5 RESULTADOS PARA OS MARCADORES DE PROGNÓSTICO DO CÂNCER GÁSTRICO

A Tabela 39 apresenta os resultados encontrados nesse estudo para as análises que buscaram marcadores genéticos de prognóstico do câncer gástrico.

Dentre os polimorfismos avaliados, rs909253 do gene *TNFB* foi associado a um melhor prognóstico e rs4644 do gene *LGALS3* a um pior prognóstico do câncer gástrico. O polimorfismo rs909253 do gene *TNFB* foi associado a um maior tempo de sobrevida global e livre de doença, na amostra total (N=178) e na estratificada para o subtipo histológico difuso (N=112). Já o polimorfismo rs4644 do gene *LGALS3* apresentou menor tempo de sobrevida livre de doença na amostra total de casos.

Não serão apresentadas as associações dos haplótipos com as curvas de sobrevida (detalhes na Seção de Discussão).

Tabela 39. Polimorfismos associados às curvas de sobrevida global e livre de doença e modelos genéticos nos quais as associações foram detectadas, separadamente para a amostra total (N=178) e para os casos com subtipo histológico difuso (N=112)

Polimorfismo (gene)	Casuística	Prognóstico	Sobrevida	Modelo Genético	Alelo associado
rs909253 (<i>TNFB</i>)	Amostra total	Ruim	Global e Livre de Doença	Genótipos, Alelos, Recessivo e Dominante	Alelo G (intron)
	Subtipo Difuso	Ruim	Global e Livre de Doença	Genótipos, Alelos, Recessivo e Dominante	
rs4644 (<i>LGALS3</i>)	Amostra total	Bom	Livre de Doença	Alelos e Dominante	Alelo A (His) <i>missense</i> (Pro→His)

4.4 Verificação da adequação do tamanho amostral e/ou poder estatístico

Respeitando todos os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, o número final da amostra de controles (N=262) e casos (N=178) obtido foi menor do que o esperado inicialmente no desenho do estudo. Dessa forma, realizamos o cálculo do tamanho amostral estimado e/ou do poder estatístico *post hoc* (após obtenção dos resultados), a fim de verificar se o número de indivíduos foi adequado para os testes aplicados nas etapas dos diferentes desenhos de estudo desse trabalho (caso-controle, associação com variáveis anatomopatológicas e seguimento).

Para o cálculo amostral no estudo caso-controle, foi utilizado um *software* disponibilizado pelo Laboratório de Epidemiologia e Estatística (Lee) criado em 1995 junto à Faculdade de Medicina da USP (*link* disponível em http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/di_cas_con.html). Utilizamos como referência os dois polimorfismos que foram associados com a suscetibilidade ao câncer gástrico na amostra total de casos (N=178): rs1042522 do gene *TP53* e rs699947 do gene *VEGFA*, que conferiram risco aumentado e proteção, respectivamente. Para a casuística estratificada para o subtipo difuso (N=112), somente *TP53* foi significativamente associado e utilizado nos cálculos do tamanho amostral ideal. O objetivo foi verificar qual a chance de os resultados encontrados serem verdadeiramente positivos.

Para esses cálculos, além do nível de significância α de 5% (erro do tipo I) e do poder estatístico desejado ($1-\beta$) estabelecido entre 70 e 80%, foram utilizadas as frequências genóticas e alélicas detectadas no grupo de casos (para ambos os polimorfismos) e os respectivos valores de OR obtidos nos modelos de regressão logística ajustados. A Tabela 40 apresenta os resultados da estimativa de tamanho amostral esperado, que foram calculados para os Modelos Genéticos Dominante e de Alelos (que apresentaram resultados significativos para ambos os polimorfismos), para a amostra total e estratificada para casos com subtipo difuso.

Resultados

Tabela 40. Estimativa de tamanho amostral calculada para o estudo caso-controle para um poder de 70 e 80%, utilizando-se como referência um nível de significância α de 5%, valores de frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos de *TP53* e *VEGFA* observadas no grupo de casos e os respectivos valores de *Odds Ratio* obtidos nos diferentes modelos genéticos, separadamente para a amostra total ou estratificada para o subtipo difuso

Polimorfismo (Gene)	Casuística	Modelo Genético	Genótipos/Alelos	frequência (%)		OR	Poder 70%		Poder 80%	
				Casos	Controles		N Casos	N Controles	N Casos	N Controles
rs1042522 (<i>TP53</i>)	Total	Dominante	GC+CC	66,9	51,2	2,07	82	123	103	154
		Alelos	alelo C	41,9	34,7	1,45	159,5	239	202	303
	Subtipo Difuso	Dominante	GC+CC	71,4	51,2	2,90	34	78	43	99
		Alelos	alelo C	46,4	34,7	1,90	45	103,5	57,5	132
rs699947 (<i>VEGFA</i>)	Total	Dominante	CA+AA	55,1	63,8	0,61	178	267	225	338
		Alelos	alelo A	34,0	40,5	0,69	160	240	202	303

N: número de indivíduos; OR: *Odds ratio*

O cálculo do tamanho amostral demonstrou que nosso estudo caso-controle foi capaz de atingir um poder estatístico estimado entre 70 e 80% para os resultados das associações observadas entre ambos os polimorfismos e a suscetibilidade para o câncer gástrico, seja de risco (rs1042522 de *TP53*) ou de proteção (rs699947 de *VEGFA*), considerando-se tanto a amostra total de casos, quanto estratificada para o subtipo histológico difuso, para todos os modelos genéticos significativamente associados.

Quando consideramos o Modelo Genético Dominante, o número amostral necessário para se atingir um bom poder é sempre menor, uma vez que a frequência do polimorfismo observada nos grupos amostrais aumenta devido ao agrupamento de indivíduos com a presença do alelo polimórfico.

O número amostral de 178 casos para as análises envolvendo as associações entre os genótipos/alelos e as variáveis anatomopatológicas demonstrou-se suficiente quando calculado no *software* GPower (<http://www.gpower.hhu.de/>). Para as análises com tabela de contingência (Qui-Quadrado e/ou Teste Exato de Fisher), o grau de liberdade (gl) é expresso como $gl = (\text{número de colunas} - 1) \times (\text{número de linhas} - 1)$. As variáveis anatomopatológicas do nosso estudo foram sempre analisadas na forma agrupada em duas categorias (número de linhas=2). Desta forma, os graus de liberdade (gl) de nosso estudo variaram de 1 a 2 dependendo do Modelo Genético utilizado: enquanto o Modelo de Genótipos apresentava três categorias (número de colunas=3), os Modelos Dominante, Recessivo e de Alelos possuíam duas categorias (número de colunas=2).

Considerando-se a amostra total de casos (N=178) e tamanho de efeito de 25%, todos os Modelos Genéticos avaliados apresentaram valores satisfatórios de poder estatístico (85,7% a 91,6%). Porém, quando a amostra foi estratificada somente para os casos com subtipo difuso, esse valor caiu para 65,5% a 75,4% (Tabela 41).

Os resultados das associações com o subtipo intestinal (N=59) foram excluídos desse estudo, uma vez que os valores de poder estatístico obtidos para essas análises estariam entre 38,7% a 48,2% (Tabela 41).

Tabela 41. Estimativa do poder estatístico observado para as análises de associação entre os polimorfismos e as características anatomopatológicas nos diferentes modelos genéticos utilizando-se como referência um nível de significância α de 5%, valores de graus de liberdade e valores de tamanhos de efeito de 20 e 25%, separadamente para a amostra total (N=178) ou estratificada por subtipo histológico difuso (N=112) e intestinal (N=59)

Modelo Genético	Casuística	gl	Tamanho do efeito	Poder observado (%)
Genótipos	Amostra Total	2	0,20	66,3
			0,25	85,7
	Subtipo Difuso	2	0,20	45,9
			0,25	65,5
	Subtipo Intestinal	2	0,20	26
			0,25	38,7
Alelos, Dominante e Recessivo	Amostra Total	1	0,20	76,1
			0,25	91,6
	Subtipo Difuso	1	0,20	56,2
			0,25	75,4
	Subtipo Intestinal	1	0,20	33,6
			0,25	48,4

gl: grau de liberdade

Também foram calculados os valores de poder obtidos para as análises de sobrevida, utilizando-se o *software* STATA11. Considerando-se a amostra total de 178 pacientes e o número de desfechos (99 óbitos por quaisquer causas e 79 recorrências ou morte específica pela doença), o poder foi de 93,2 e 86,9% para sobrevida global e livre de doença, respectivamente. Estratificando-se para os casos com subtipo difuso (N=112; 74 casos de óbitos por quaisquer causas e 59 recorrências ou morte específica pela doença), o poder observado foi de 84,7% e 75,9% para sobrevida global e livre de doença, respectivamente. Esses dados nos mostram que o nosso número amostral atingiu poder satisfatório também para as análises de sobrevida.

4.5 Análises funcionais *in silico*

4.5.1 Predição do efeito funcional dos polimorfismos estudados

Como análise adicional, utilizamos os *softwares* Polyphen-2 (*Polymorphism Phenotyping* v2, disponível em <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>) e

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*, disponível em <http://sift.jcvi.org/>) para predição *in silico* do efeito funcional das seis variantes genéticas do nosso estudo classificadas como *missense* e que ocasionam em uma alteração do aminoácido do produto final.

Todas as substituições foram consideradas como benignas e toleradas, com exceção do polimorfismo rs4644 do gene *LGALS3* e da mutação rs121912664 do gene *TP53*, preditas como possivelmente patogênicas (Polyphen2) e deletérias (SIFT) (Tabela 42).

Tabela 42. Polimorfismos do estudo cuja substituição acarreta em alteração de aminoácido e a predição *in silico* do efeito funcional sobre o produto final

Polimorfismo	Gene	Cromossomo	Troca aminoácido	Polyphen2	SIFT
rs1052133	<i>OGG1</i>	3	Ser326Cis	benigna	tolerada
rs2227956	<i>HSPAIL</i>	6	Thr493Met	benigna	tolerada
rs763780	<i>IL17F</i>	6	His161Arg	benigna	tolerada
rs4644	<i>LGALS3</i>	14	Pro64His	possivelmente patogênica	deletéria
rs1042522	<i>TP53</i>	17	Arg72Pro	benigna	tolerada
rs121912664 ^a	<i>TP53</i>	17	Arg337His	possivelmente patogênica	deletéria

^avariação genética descrita como mutação e não como polimorfismo

4.5.2 Construção de uma rede biológica incluindo os genes do estudo

Outra análise complementar realizada foi a construção de uma rede biológica complexa (*network*) *in silico*, por meio do *software* Gene Mania (disponível em <http://genemania.org/>), que incluiu os onze genes avaliados nesse estudo.

Foi utilizado como critério buscar somente genes que interajam entre si ou sejam co-expressos, ou cujos produtos finais interajam de forma física, possuam similaridades de domínios protéicos ou participem de vias biológicas em comum. A predição foi realizada com base nos processos biológicos descritos pelo *Gene Ontology* e por meio de dados de publicações científicas prévias.

Para essa análise foi incluído somente o produto dos genes do presente estudo, sem considerar outras moléculas que possam atuar de forma intermediária promovendo uma comunicação indireta entre eles, o que tornaria a interpretação ainda mais

complexa. A Figura 21 exemplifica a complexidade de interação que existe entre os genes e seus produtos funcionais dentro de uma mesma rede funcional.

Figura 21. Representação gráfica da rede biológica complexa construída com base nos processos biológicos descritos pelo *Gene Ontology*, ilustrando as interações gênicas, genes co-expressos (roxo), interações físicas entre os produtos proteicos (rosa), similaridades de domínios protéicos (marrom) ou participação de vias biológicas comuns (azul), considerando-se os onze genes investigados nesse estudo (*COX-2/PTGS2*, *OGG1*, *TNFB/LTA*, *TNFA*, *HSPA1L*, *HSPA1B*, *VEGFA*, *IL17F*, *LGALS3*, *PHB* e *TP53*)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 O papel da inflamação no câncer gástrico e a hipótese do estudo

O câncer é uma doença multifatorial e poligênica, resultado da combinação entre fatores ambientais, estilo de vida e genéticos. Inúmeros *loci* polimórficos tem sido investigados na tentativa de buscar possíveis marcadores para prevenção, diagnóstico e tratamento, ou pelo menos, para nos auxiliar a elucidar as vias moleculares envolvidas na patogênese dessa doença tão complexa.

Embora inúmeros estudos em larga escala estejam sendo conduzidos, a busca por variantes genéticas baseada em estudos gene-candidatos ainda são predominantes na literatura. Esses estudos são hipótese-dirigidos e dependem de conhecimento prévio de possíveis vias afetadas pela doença, que nos auxiliam na escolha dos genes e variantes a serem investigadas. Esses genes são escolhidos baseando-se na função conhecida ou predita, fundamentados por estudos experimentais e testes *in silico* ou ainda baseando-se em estudos que tenham associado a variante genética previamente ao fenótipo avaliado.

A inflamação tem atraído atenção como um dos mecanismos biológicos que pode contribuir para a aquisição das alterações que favorecem e promovem a carcinogênese, facilitando o surgimento das demais características necessárias requeridas para a evolução e progressão dessa doença, sendo incluída recentemente na nova lista dos *hallmarks* do câncer, proposta inicialmente por Hanahan e Weinberg em 2000 (Hanahan, Weinberg, 2011).

Tem sido demonstrado que uma inadequada erradicação do patógeno *H. pylori*, uma sinalização inflamatória prolongada e exacerbada, conjuntamente com defeitos em mecanismos anti-inflamatórios, podem contribuir para o estabelecimento de um estado de inflamação crônica no estômago. Esse microambiente mais oxidativo e nitrosativo aumenta a chance de danos ao DNA e mutações somáticas, favorecendo a carcinogênese gástrica, em etapas de iniciação, promoção e progressão tumoral (Chang et al, 2014).

A evasão ativa das células tumorais contra o ataque e eliminação pelo sistema imune evidenciam o seu papel dual. Esse passa a atuar em um sentido pró-tumorigênico, promovendo um microambiente favorável para a evolução e progressão da doença, uma

vez que o tumor esteja estabelecido. A inflamação associada ao tumor fornece moléculas bioativas como fatores de crescimento que mantêm a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pró-angiogênicos e enzimas remodeladoras da matriz extracelular, facilitando a angiogênese, invasão e metástase, além de sinais de indução que levam à ativação de transição epitélio-mesênquima (Hanahan, Weinberg, 2011).

Dessa forma, levando em consideração o importante papel da inflamação crônica descrita no câncer gástrico, levantamos a hipótese de que variações em genes relacionados à resposta inflamatória pudessem atuar conjuntamente com outros fatores etiológicos descritos, contribuindo para a iniciação e desenvolvimento tumoral, bem como para a progressão e evolução dessa doença. Dessa maneira, supomos que a presença de variantes genéticas que resultem em uma resposta mais pró-inflamatória poderia favorecer ao desenvolvimento de um microambiente cronicamente inflamado no estômago, selecionando células malignas capazes de escapar a imunovigilância, promovendo a iniciação tumoral. Além disso, essas variantes genéticas poderiam influenciar na agressividade do fenótipo, no comportamento biológico e curso clínico de um tumor já estabelecido ao desempenhar papel funcional no direcionamento do sistema imune para uma atuação mais pró-tumorigênica.

Corroborando essa hipótese, um estudo transcriptômico conduzido em nosso grupo (Figura 4) demonstrou que a resposta inflamatória e o sistema imune apareceram em destaque dentre os processos biológicos desregulados capazes de comprometer a progressão e predizer um pior prognóstico do câncer gástrico (Pasini et al, 2014).

Dentro desse contexto, esse estudo teve como principal objetivo avaliar se polimorfismos em genes relacionados à resposta inflamatória poderiam possivelmente atuar como marcadores genéticos de suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer gástrico e, uma vez o tumor estabelecido, se poderiam predizer o comportamento tumoral, atuando como marcadores de progressão e/ou prognóstico da doença.

Levando em consideração a heterogeneidade do câncer gástrico e que os métodos de diagnóstico, estadiamento e prognóstico utilizados para esse tumor ainda se baseiem nas suas características clinicopatológicas, a busca por possíveis marcadores moleculares que pudessem atuar conjuntamente com os métodos convencionais é de extrema relevância. Esses marcadores poderiam nos auxiliar a identificar pacientes com

maior risco para a doença, para recidiva, que necessitem de um maior acompanhamento ou que se beneficiariam de terapias adicionais.

Ainda não é claro se (e como) esses polimorfismos genéticos seriam capazes de influenciar no comportamento do tumor, na agressividade do fenótipo ou modificar a patogênese e o curso da doença devido à heterogeneidade dos estudos publicados até então. No entanto, a investigação sobre a influência dessas variantes poderia nos fornecer pistas ou evidências sobre mecanismos que expliquem as diferenças interindividuais na suscetibilidade e progressão do câncer de estômago. Além disso, esse tipo de estudo nos auxilia a compreender melhor os aspectos moleculares envolvidos no processo de carcinogênese, da patogênese e até mesmo esclarecer melhor o papel funcional dos genes selecionados para a doença em questão.

Todos os polimorfismos selecionados para esse estudo foram escolhidos pelo importante papel bem descrito em processos imunológicos e resposta inflamatória. As variantes escolhidas compreendem diversas localizações gênicas, conformes ilustradas previamente na Figura 6: regiões codificantes de proteínas, cujas trocas de nucleotídeos podem alterar a sequência de aminoácidos final (*missense* ou não-sinônima), ou não acarretam em mudança na sequência de aminoácidos (sinônimas ou silenciosas). Também escolhemos variações em regiões regulatórias não-codificantes, que incluem a região intrônica (dentro de um intron), ou promotora (podendo levar a alterações nas sequências de sítios de ligação para fatores de transcrição) e em regiões transcritas, porém não traduzidas *upstream* ou *downstream* ao gene (5'-UTR e 3'-UTR), que representam regiões associadas geralmente com a manutenção da estabilidade do RNAm. Porém, independente da região escolhida, todos os polimorfismos apresentam descrição de possível alteração funcional, seja em estrutura ou em regulação da expressão gênica.

5.2 O desenho experimental e a condução do estudo

A Figura 9, no início da Seção de Resultados, apresenta o planejamento experimental e o modo como as análises de associação foram conduzidas em nosso estudo.

Inicialmente realizamos um estudo caso-controle, em que avaliamos as diferenças na distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos

selecionados entre os grupos de pacientes com câncer gástrico e indivíduos controles, a fim de verificar se poderiam atuar como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico. As experiências adquiridas com estudos de associação em doenças complexas demonstram que inúmeras variantes genéticas podem estar envolvidas com um maior risco para doenças, mesmo que com pequeno efeito. Para tanto, existe a necessidade de se utilizar um número amostral apropriado (que é calculado a partir das frequências alélicas das variantes analisadas), com poder estatístico adequado para confirmar tais associações, além de se ter conhecimento prévio sobre um bom desenho experimental e estratégias analíticas adequadas para esse tipo de estudo (Lewis, Knight, 2012). Nossas análises foram realizadas concomitantemente em quatro modelos genéticos (Modelo de Genótipos, de Alelos, Dominante e Recessivo), construídos com base nas combinações de genótipos. Esses modelos representam formas complementares de análises em estudos de associação genética e que nos permitem entender melhor qual a influência e o peso de cada um dos alelos para a manifestação do fenótipo. Eles garantem que nenhum resultado importante seja perdido, além de permitir que seja investigado o possível modo de herança de um determinado polimorfismo. As associações observadas nos diferentes modelos reforçam ainda mais o significado dos resultados encontrados, diminuindo a chance de associações ao acaso (Lewis, Knight, 2012). As frequências genotípicas e alélicas de todos os polimorfismos avaliados em nossa amostra foram similares às disponibilizadas pelo Projeto 1000 Genomas e estão descritas na Tabela 6.

Em seguida, fizemos uma revisão detalhada das características anatomopatológicas desses tumores e investigamos a associação das mesmas com os polimorfismos do estudo, verificando se eram capazes de prever melhor ou pior progressão e agressividade da doença. Por fim, após realizar o seguimento desses pacientes por até 172 meses, investigamos se essas variantes genéticas foram capazes de influenciar nas curvas de sobrevida global e livre de doença, verificando sua influência no prognóstico do câncer gástrico.

É muito importante considerar que o câncer gástrico é uma doença muito heterogênea e a combinação de casos com fenótipos distintos e diferentes etiologias podem prejudicar os resultados dos estudos de associação genética, levando a resultados falso-negativos. Quanto maior for a homogeneidade na definição dos casos, maior será a chance de que uma associação genética real seja detectada. Visto que os subtipos

histológicos do câncer gástrico (intestinal e difuso) possuem etiologias distintas, ao investigar a amostra total de casos com câncer gástrico, o efeito que seria observado exclusivamente para um determinado subtipo poderia ser diluído ou mesmo perdido. Dessa forma, inicialmente os resultados das associações entre os polimorfismos genéticos e as características anatomopatológicas foram apresentados considerando-se a amostra total de casos (N=178), mas também decidimos estratificar nossa amostra para os diferentes subtipos histológicos e verificar se existiam associações específicas e particulares para cada um deles. Devido ao baixo número amostral do subtipo intestinal em nossa casuística (N=59) e ao baixo poder estatístico observado, nosso estudo focou a atenção no subtipo difuso. Esse subtipo foi detectado em 63% de nossa amostra (N=112), descrito por possuir um perfil mais inflamatório e um pior prognóstico. Embora esses resultados apresentem grande relevância biológica dentro do contexto do câncer gástrico, devem ser interpretados com cautela, levando em consideração o número amostral reduzido de 112 pacientes para essas análises (o tamanho amostral será discutido com mais detalhes posteriormente na Seção de Discussão).

É importante pontuar que o estudo de polimorfismos individuais nem sempre é tão informativo, visto que eles podem estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais no mesmo gene ou em outros genes e, nesse sentido, as análises de haplótipos podem ser complementares e, muitas vezes mais preditivas do que análises envolvendo polimorfismos únicos. Alguns resultados significativos observados podem realmente representar um efeito funcional da variante sobre o fenótipo avaliado, porém também podem ser associações indiretas causadas pelo desequilíbrio de ligação com um SNP verdadeiramente causal. Dessa forma, também avaliamos quais variantes localizadas no mesmo *locus* cromossômico encontraram-se em desequilíbrio de ligação em nossa amostra e construímos os possíveis blocos haplotípicos. Os haplótipos formados também foram incluídos nas análises que investigaram marcadores genéticos de suscetibilidade e progressão do câncer gástrico.

Outra estratégia para tentar compreender o efeito das variações genéticas que levam a uma alteração do aminoácido é a utilização de *softwares* de predição *in silico*, que avaliam o possível efeito funcional dessas variantes na proteína final, classificando-as como toleradas/benignas até deletérias/potencialmente patogênicas. Seis das variações genéticas do nosso estudo eram do tipo *missense* e foram avaliadas pelos *softwares* Polyphen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, disponível em

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>) e SIFT (disponível em <http://sift.jcvi.org/>). Os resultados dessas avaliações serão apresentados na discussão individual de cada gene estudado.

5.3 Características descritivas da amostra estudada

Nosso estudo selecionou 262 indivíduos controles e 178 casos recrutados no HC-FMUSP entre junho/2001 e outubro/2006. O desenho inicial do estudo foi conduzido com o intuito de parear as amostras de casos e controles por gênero e idade, porém essas variáveis apresentaram diferenças entre os grupos após criteriosa revisão e seleção de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente definidos. Dessa forma, foram incluídas nas análises multivariadas subsequentes como covariáveis de ajuste, juntamente com tabagismo e etilismo, que se comportaram como variáveis de risco independentes associadas ao câncer gástrico. Dados da literatura confirmam o tabaco e álcool como fatores de risco para esse tipo de neoplasia (Ferrari, Reis, 2013; Guggenheim, Shah, 2013).

Todos os pacientes com câncer gástrico selecionados pelo nosso estudo tiveram os seus laudos anatomopatológicos recuperados pelos prontuários clínicos eletrônicos e esses foram minuciosamente revisados. As características anatomopatológicas selecionadas para esse estudo e que foram usadas nas análises de associação compreenderam: idade de acometimento ao diagnóstico, tamanho do tumor, subtipo histológico de Lauren, profundidade de invasão (pT), invasão perineural, invasão vascular linfática e sanguínea, infiltrado inflamatório, desmoplasia, invasão para outros órgãos (pT4b), comprometimento e metástase linfonodal (pN), metástase à distância (pM) e estadiamento. Inicialmente foram incluídos 245 casos, porém, após reanálise minuciosa dos laudos anatomopatológicos e exclusão de casos que não preencheram os critérios estabelecidos, o número amostral atingido foi de 178 pacientes. A verificação da adequação do tamanho amostral em nosso estudo será detalhada em tópico apresentado a seguir.

Em nossa amostra de casos com câncer gástrico, observamos que houve uma maior prevalência do sexo masculino (61,2%) e a média de idade ao diagnóstico foi de 61,8 anos. Um estudo brasileiro conduzido pelo INCA/RJ, que incluiu pacientes atendidos pelo sistema entre 2009 e 2012, também observou predominância de homens

afetados (64,4%), com média de idade de 61,7 anos (Guedes et al, 2014). A maior prevalência em homens do que em mulheres corresponde às estimativas globais e nacionais (Ferlay et al, 2015; INCA, 2016).

Em relação ao subtipo histológico, observamos predomínio do subtipo difuso de Lauren (62,9%), que também predominou na amostra do INCA (54,5%) (Guedes et al, 2014). O subtipo difuso foi associado a fatores de pior progressão da doença em nossa amostra: presença de infiltrado perineural, desmoplasia moderada à intensa, metástase linfonodal e diagnóstico em estádios mais avançados (III+IV) da doença, além de apresentar menor idade de acometimento ao diagnóstico (59,8 vs 64,6 anos), quando comparado ao subtipo intestinal. Alguns tumores (3,9%) foram classificados como subtipo misto, pois apresentaram características histopatológicas de ambos os subtipos, não sendo possível classificá-los dentro de um grupo específico.

O tamanho médio do tumor observado foi de 5,9 cm. Ainda não existe um consenso sobre o fator prognóstico do tamanho do tumor no câncer gástrico, embora alguns estudos tenham mostrado que um tumor com maior tamanho seja considerado fator independente de pior prognóstico para esse tipo neoplasia (Saito et al, 2006; Guo et al, 2013). Não existe um ponto de corte bem estabelecido para tamanho de tumor no câncer gástrico, porém um estudo com 2.379 indivíduos sugeriu um ponto de corte ótimo de 4 cm, e observou associação com idade, localização tumoral, tipo macroscópico, classificação de Lauren, profundidade de invasão e o *status* dos linfonodos regionais (Guo et al, 2013). Nosso estudo utilizou um ponto de corte arbitrário de 5 cm e observou que tumores acima de 5 cm foram significativamente associados à maior profundidade (t2+t3), desmoplasia moderada à intensa, presença de invasão sanguínea, invasão de órgãos, metástase linfonodal e estadiamento mais avançado (III+IV) ($p<0,05$) (dados não apresentados).

Em relação à invasão vascular, foi observada maior frequência de invasão linfática (60,5%) do que sanguínea (50,6%). Além disso, 55,8% dos pacientes desse estudo apresentaram invasão perineural e 62,2% e 50,5% apresentaram desmoplasia e infiltrado inflamatório variando de moderado a intenso, respectivamente.

Somente 8,5% dos pacientes apresentaram tumores precoces que invadiram até a mucosa. A grande maioria (81,5%) apresentou tumor avançado ao diagnóstico, sendo que 3,4% apresentaram invasão para outros órgãos (pT4b). Nosso estudo corrobora

dados de outro trabalho brasileiro, que descreve que o diagnóstico de câncer gástrico avançado no país predomina em 85% dos casos (Zilberstein et al, 2013).

Em relação à presença de metástase, 77,4% dos casos apresentaram metástase linfonodal e 14,6% apresentaram metástase à distância (em nossa casuística foram observadas metástases peritoneais, hepáticas, em mesocólon, pâncreas e cólon). E houve maior prevalência de pacientes diagnosticados e submetidos à cirurgia em estadiamento III ou IV da doença (69,4%).

Investigamos em nossa casuística se o perfil de infiltrado inflamatório seria capaz de prever uma pior progressão da doença, porém dentre as variáveis anatomopatológicas avaliadas nesse estudo, a única que foi associada a um perfil mais inflamatório foi a presença de uma desmoplasia variando de moderada a intensa. Embora o subtipo difuso seja associado a um perfil mais inflamatório (Dicken et al, 2005), não observamos essa associação em nossa amostra. É importante ressaltar que a caracterização da inflamação no nosso estudo foi única e exclusivamente por presença de infiltrado inflamatório variando de “ausente a leve” e “moderado a intenso”. Para análises mais específicas deveriam ser utilizados marcadores específicos capazes de melhor caracterizar e quantificar o perfil inflamatório dos tumores na amostra.

Todos os pacientes realizaram a ressecção cirúrgica logo em seguida ao diagnóstico de câncer gástrico e, então, foram acompanhados até a data de seguimento final, estabelecida em março/2016. Ao final desse período (tempo máximo de seguimento de 172,5 meses), as sobrevidas global e livre de doença foram de 39,3% e 48,5%, respectivamente.

Quando consideramos 60 meses de tempo de seguimento, esses valores praticamente não sofreram alterações (42,3% e 50,2%, respectivamente), indicado que esse se apresenta como um bom tempo de seguimento para esses pacientes. Para pacientes diagnosticados em estágio III+IV, as sobrevidas global e livre de doença observadas em cinco anos foram de 29,5% e 36,0%, respectivamente. Um estudo brasileiro, cujos pacientes realizaram gastrectomia total com intenção curativa, descreveu 49,2 % de sobrevida global em 5 anos (da Costa et al, 2015).

Observamos que as seguintes variáveis anatomopatológicas foram associadas a um menor tempo de sobrevida global e livre de doença, sendo capazes de prever um pior prognóstico do câncer gástrico na nossa amostra total de casos (N=178): tumores maiores que 5 cm, maior profundidade de invasão (t3+t4), presença de invasão

perineural, sanguínea e linfática, invasão para outros órgãos, presença de metástase linfonodal e à distância, estadiamento mais tardio (III+IV) e subtipo histológico difuso (todas elas foram incluídas como covariáveis de ajuste nos modelos multivariados subsequentes). Em consistência com os resultados, inúmeros estudos têm descrito achados semelhantes (Wang et al, 2011; Wang et al, 2013).

Quando analisados somente os casos com subtipo histológico difuso em nossa amostra, as sobrevidas global e livre de doença foram menores do que quando comparadas à amostra total de casos (30,2% e 39,3%, respectivamente). Para esse subgrupo, com exceção de invasão perineural (que perdeu a associação com sobrevida livre de doença) e invasão para outros órgãos (que perdeu associação com as sobrevidas global e livre de doença), as demais características anatomopatológicas mantiveram-se associadas às curvas de sobrevida e foram capazes de predizer um pior prognóstico do câncer gástrico. Um estudo anterior demonstrou que estadiamento avançado (III e IV) atuou como fator de pior prognóstico, diminuindo a sobrevida global, tanto considerando a amostra total quanto estratificada por subtipos histológicos (Garcia-Gonzales, 2012).

Levando em consideração a alta prevalência do câncer gástrico, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, atrelado à detecção e diagnóstico quase sempre realizados em estágios mais tardios da doença e aos desfechos muitas vezes desfavoráveis, estudos epidemiológicos como o nosso são de extrema importância. Por meio deles, podemos compreender melhor o comportamento particular dos tumores gástricos na população brasileira, de sua progressão, visando aprimorar estratégias de detecção, prevenção e tratamentos diferenciados.

5.4 Verificação do tamanho amostral e/ou poder estatístico

O tamanho amostral é uma das questões mais críticas em estudos de associação, pois ele assegura, pelo menos em parte, a confiabilidade dos resultados obtidos. Tamanhos de amostra reduzidos diminuem o valor do poder estatístico, que é um indicador que mede a chance de se detectar uma significância estatística quando ela realmente existir, ou seja, a chance de os resultados encontrados serem verdadeiramente positivos.

Na etapa de planejamento desse estudo (*a priori*) foi realizado um cálculo de tamanho amostral ideal. Esse cálculo baseia-se principalmente em três fatores: nível de significância α , poder estatístico ($1-\beta$) e magnitude da diferença (tamanho do efeito). Para um nível α determinado, o poder do teste aumenta de acordo com o aumento do tamanho amostral. O tamanho de efeito não deve ser muito alto, uma vez que reduz o tamanho amostral estimado e aumenta a probabilidade de erro do tipo II (falsos negativos). Geralmente se aceita um poder de teste de 80%, ou seja, uma probabilidade de 80% ou mais de se encontrar uma diferença estatística quando essa realmente existir.

Como o número amostral final obtido pelo estudo foi menor do que o proposto inicialmente, respeitando todos os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, optamos por realizar o cálculo do tamanho amostral estimado e/ou do poder estatístico *post hoc* (após obtenção dos resultados) e verificar se foram adequados para os diferentes desenhos de estudo desse trabalho (caso-controle, associação com variáveis anatomopatológicas e seguimento).

De maneira geral, observamos que a nossa amostra (N=178) atingiu um poder estatístico estimado entre 70 e 80% quando considerado os resultados significativos obtidos no estudo caso-controle. O cálculo foi baseado nos valores de OR e frequências genotípicas/alélicas observadas no grupo de casos para os dois polimorfismos que apresentaram associação significativa com o câncer gástrico (rs1042522 de *TP53* e rs699947 de *VEGFA*).

Para a análise que incluiu somente os casos com subtipo difuso, mesmo sendo menor, o número amostral de 112 casos atingiu poder acima de 80%, uma vez que o valor do risco do polimorfismo rs1042522 de *TP53* em predizer o câncer gástrico foi ainda maior do que quando considerada a amostra total.

Os valores de poder foram considerados aceitáveis em todos os modelos genéticos avaliados. Porém, de modo geral, observamos que quando consideramos o Modelo Genético Dominante, o número amostral necessário para se atingir um bom poder é sempre menor, uma vez esse modelo considera o agrupamento de indivíduos com a presença do alelo polimórfico e, portanto, aumenta a frequência do polimorfismo observada para o grupo de casos.

Para as análises envolvendo as associações dos polimorfismos com as características anatomopatológicas, a amostra total de casos (N=178) apresentou valores satisfatórios de poder estatístico para todos os Modelos Genéticos avaliados (85,7% a

91,6%), quando consideramos um tamanho de efeito de 25%. Porém, quando a amostra foi estratificada por subtipo histológico, esses valores diminuem para 65,5% a 75,4% para os casos com subtipo difuso e 38,7% a 48,2% para casos com subtipo intestinal, dependendo do modelo genético avaliado. Dessa forma, optamos por remover os resultados das análises com o subtipo intestinal devido ao baixo poder estatístico e uma maior chance de detecção de falsos-positivos (erro do tipo I).

Considerando-se as análises de sobrevida global e livre de doença, o nosso tamanho amostral apresentou poder acima de 85% nas análises envolvendo a amostra total (N=178). O valor do poder diminuiu com a redução amostral, após estratificação para o subtipo difuso (N=112), porém ainda manteve-se dentro de um valor aceitável (acima de 76%).

Os resultados das análises de haplótipos foram apresentados somente considerando-se a amostra total de casos (N=178), uma vez que o poder estatístico diminui consideravelmente quando consideramos conjuntamente a baixa frequência de prevalência de cada haplótipo e o número amostral reduzido para cada subtipo histológico. Foram também excluídas as análises das associações dos haplótipos com as curvas de sobrevida, pelo mesmo motivo descrito acima.

Devemos levar em consideração que alguns polimorfismos estudados e algumas das características anatomopatológicas avaliadas possuem baixa prevalência em nossa amostra e esse cálculo do poder estimado não levou em conta essa informação. Por exemplo, detectamos invasão para outros órgãos em somente 3,4% da nossa amostra total. Dessa forma, esses resultados devem ser analisados com cautela (principalmente na amostra de casos estratificada para o subtipo difuso). Devemos sempre estar atentos aos erros do tipo I (falso-positivos) e erros do tipo II (falso-negativos).

5.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Em estudos de associação, inicialmente conferimos se os SNPs estão em EHW antes de realizar as associações com os fenótipos. O EHW pressupõe que as frequências genotípicas e alélicas de uma amostra permanecem constantes de geração para geração e existe uma distribuição estável de frequências entre os homozigotos (para cada alelo) e os heterozigotos (Lunetta, 2008). O Equilíbrio é uma consequência do cruzamento

aleatório dentro uma população, na ausência de mutação, seleção natural e migração, em que os alelos maternos e paternos são herdados independentemente (Lunetta, 2008).

Quando não há certeza sobre a base do fenótipo estudado, o Equilíbrio é testado na amostra completa, porém em estudos caso-controle costuma-se testar também em ambos os grupos separadamente. Isto porque os polimorfismos associados ao fenótipo em questão podem não se apresentar em Equilíbrio. Geralmente os SNPs cujos genótipos não obedecem ao Equilíbrio são excluídos das análises de associação, mas essa decisão fica a critério do pesquisador e depende do número de fatores e SNPs que estão sendo estudados (Lunetta, 2008).

Em nosso estudo, os polimorfismos rs5275 (*COX-2*), rs763780 (*IL17F*) e rs1042522 (*TP53*) apresentaram desvios do EHW (estabelecendo como critério valores de $p < 0,01$) considerando-se a amostra total, ou seja, as frequências genotípicas observadas na nossa amostra não se apresentaram de acordo com as esperadas pela suposição. Desvios no Equilíbrio podem ser decorrentes de inúmeros fatores: erros de genotipagem, casamento não aleatório, seleção natural, estratificação populacional ou acaso (Lewis, Knight, 2012). Além disso, ao estratificarmos entre casos e controles, os polimorfismos *COX-2* e *TP53* apresentaram desvio do Equilíbrio no grupo de indivíduos controles e não o de casos, indicando que possivelmente as amostras controles foram oriundas de uma combinação de subpopulações genéticas distintas.

Além disso, devemos considerar a heterogeneidade genética presente na população brasileira, que apresenta grande miscigenação e também pode ser uma possível explicação para os desvios do EHW. A estratificação populacional pode ser um fator de confusão em estudos de associação e deve ser levada em consideração.

Para realizar a análise de haplótipos, um pré-requisito básico é que todos os polimorfismos incluídos na análise apresentem-se em EHW. Por essa razão, os polimorfismos rs5275 e rs763780, dos genes *COX-2* e *IL17F*, respectivamente, não entraram nas análises que compararam as distribuições haplotípicas no estudo caso e controle. Porém, como o polimorfismo rs5275 do gene *COX-2* apresentou-se em Equilíbrio no grupo de casos com câncer gástrico, foi possível incluí-lo nas análises que investigaram a associação entre os blocos haplotípicos e as variáveis anatomopatológicas.

5.6 Considerações importantes e limitações do estudo

Embora nosso estudo traga novas informações no que diz respeito ao papel de variantes genéticas no câncer gástrico, dentro de um contexto de inflamação, algumas considerações importantes sobre esse estudo precisam ser pontuadas, levando em conta os vieses e limitações para que os resultados possam ser melhor interpretados.

Os resultados para cada gene serão discutidos separadamente a seguir, porém é muito importante lembrar que o câncer gástrico é resultado de uma complexa interação entre fatores ambientais, estilo de vida e inúmeros fatores genéticos, em que inúmeras variantes genéticas atuam em conjunto, cada uma contribuindo aditivamente com um pequeno incremento no risco. Nosso estudo gene-candidato deve ser pensado dentro de um contexto mais amplo e integrativo em que os genes não atuam sozinhos e nem possuem funções exclusivas, mas sim fazem parte de sistemas complexos, interagindo entre si direta ou indiretamente dentro de uma mesma via ou em vias biológica distintas.

Para exemplificar essa complexidade, construímos uma rede biológica funcional *in silico* por meio do *software* Gene Mania (disponível em <http://genemania.org/>), que evidenciou as possíveis interações entre os onze genes avaliados nesse estudo e/ou seus respectivos produtos (Figura 21). O objetivo foi demonstrar a importância de avaliarmos uma hipótese de forma mais integrativa em um contexto de “Biologia de Sistemas”. A alteração em um gene chave dentro dessas redes complexas pode perturbar todo o sistema ou pode ser compensada por outras moléculas com funções similares.

É importante lembrar também que focamos no papel desses genes em um contexto inflamatório, mas eles são pleiotrópicos e estão inseridos em inúmeros outros processos biológicos e possuem muitas outras funções relevantes para o câncer. Além disso, os processos inflamatórios também fazem parte de uma rede complexa de sinalização regulada por inúmeros fatores, governada por interações e comunicações entre várias moléculas. Muitos genes participam em conjunto dentro da cascata de sinalização associada à resposta inflamatória. Portanto, a ausência de associação genética não significa necessariamente que não possuam influência no fenótipo observado, mas que podem estar sendo compensados por outras moléculas que possuam funções redundantes dentro da mesma via de sinalização.

Nesse sentido, torna-se ainda mais fácil inferir que a inflamação é somente uma das características ressaltadas em nosso estudo com papel importante para o câncer gástrico. Além dela, inúmeros outros processos biológicos apresentam alteração e inúmeros outros genes, além daqueles descritos com função em resposta inflamatória, podem atuar favorecendo o desenvolvimento e progressão dessa doença.

Como será descrito em detalhes a seguir, detectamos que o polimorfismo de *TP53* (o gene supressor de tumor mais descrito na literatura) foi o único associado ao risco aumentado para o desenvolvimento do câncer. Esse resultado seria esperado visto que todos os outros genes foram escolhidos com base na sua atuação como mediadores de processos inflamatórios, sendo mais propensos a afetar o comportamento biológico e a progressão tumoral do que a suscetibilidade à doença propriamente dita. E corroborando essa hipótese, os polimorfismos analisados apresentaram associações relevantes com as características anatomopatológicas analisadas, como serão descritos e discutidos na sequência.

Embora estejamos analisando genes com papéis de modulação da resposta inflamatória, nenhum polimorfismo estudado foi capaz de prever a intensidade de infiltrado inflamatório. Porém, não podemos afirmar que não esteja ocorrendo uma alteração na regulação da inflamação e da resposta imune, visto que não estamos analisando nenhum marcador específico para detectar o perfil de infiltrado inflamatório ou se o tumor apresentaria um perfil de resposta mais Th2, por exemplo. Para estudos futuros, o ideal seria a utilização de *scores* capazes de descrever e classificar o grau de inflamação desses tumores e fazer uma melhor determinação e quantificação do perfil inflamatório, discriminando os tipos específicos de células inflamatórias presentes no tumor.

Podemos enumerar uma sequência de fatores na tentativa de explicar as discrepâncias observadas em relação aos dados apresentados na literatura. Os diferentes resultados podem ser decorrentes de estratificação populacional e heterogeneidade genética entre as populações estudadas (diferentes etnias); diferenças no tamanho das amostras que estão sendo comparadas, ou mesmo pelo poder estatístico insuficiente decorrente de um tamanho amostral reduzido; resultados detectados ao acaso decorrentes de fatores de confusão; a presença de genes modificadores; interações gene-gene e gene-ambiente; tamanho do efeito da variante funcional; desequilíbrio de ligação entre os marcadores selecionados no estudo e outras variantes funcionais; ausência de

correção para múltiplos testes; erros decorrentes das diferentes sensibilidades das metodologias utilizadas na genotipagem dos polimorfismos. Além disso, podemos mencionar ainda que a penetrância e a expressividade de um dado genótipo é geralmente reduzida, principalmente considerando-se que o câncer é uma doença complexa, influenciada pela interação entre fatores genéticos e ambientais que contribuem em conjunto para a carcinogênese (Schneider et al, 2008; Yoshida et al, 2010). Além disso, embora tenhamos realizado as análises de haplótipos, existem inúmeras outras possibilidades de polimorfismos que podem ser segregados conjuntamente, formando diferentes haplótipos e que podem levar às inconsistências observadas entre os estudos publicados. Complementando ainda tudo o que foi descrito, uma característica particular em estudos com a população brasileira é considerar que um importante fator de confusão é a miscigenação e heterogeneidade genética presente na nossa população. Uma possível abordagem para considerar a estratificação populacional em estudos de associação é a investigação de marcadores de ancestralidade genética, que não foi realizada em nosso estudo.

Uma consideração estatística que deve ser destacada é a opção que tomamos de não realizar a correção para múltiplos testes (por exemplo, Correção de Bonferroni) em nossas análises. Quando múltiplas comparações são realizadas ou múltiplas hipóteses são testadas, esses testes são aplicados para diminuir a chance de detecção de resultados falso-positivos (erro do tipo I). Do ponto de vista estatístico poderíamos corrigir nossas análises para o número total de polimorfismos investigados e/ou número de variáveis anatomopatológicas estudadas e/ou para os quatro diferentes modelos genéticos avaliados e/ou número de subtipos histológicos investigados separadamente. Porém, quando considerado somente o significado estatístico das análises, a correção para múltiplos testes poderia mascarar ou excluir resultados significantes de um ponto de vista biológico.

Desta forma, optamos por não ser tão rigorosos e decidimos considerar a relevância biológica individual dos resultados obtidos (e não somente a significância estatística). A nosso ver seria muito estridente realizar a correção e poderíamos perder a associação de resultados importantes. Logicamente, é muito importante ressaltar que os resultados devem ser observados de maneira muito cautelosa e necessitam de validação em grupos amostrais distintos e maiores.

Além do que já foi mencionado até aqui, em relação às análises de associação com as curvas de sobrevida, é importante considerar que nosso estudo recuperou todos os dados dos pacientes de forma retrospectiva, então não foi “verdadeiramente” um estudo de seguimento. Nem todos os pacientes tiveram acompanhamento rigoroso em períodos de tempo pré-estabelecidos, como era a ideia inicial do estudo e, portanto, a data exata da recidiva pode não ter sido tão precisa. Porém, foi realizado um levantamento criterioso sobre todos os retornos médicos e exames disponíveis nos prontuários desses pacientes disponíveis após a cirurgia, sendo que a grande maioria realizou consultas de acompanhamento periódicas e não permaneceram longos períodos sem retorno. Somente foram consideradas as recidivas tumorais com descrição em laudo médico e comprovação por exames de imagens e exames complementares de marcadores tumorais.

Dessa forma, é evidente que deva haver um bom desenho e planejamento experimental para que um estudo de associação tenha qualidade, com estratégias analíticas bem estabelecidas, controles de qualidade e tamanho amostral e os resultados cuidadosamente interpretados, levando-se em consideração todas as limitações inerentes desse tipo de estudo.

Porém, mesmo com as limitações mencionadas e que tenham emergido muitas novas questões a partir de tudo que foi aqui mencionado, não podemos desconsiderar a validade dos resultados obtidos nesse estudo. Podemos considerar esse como sendo um estudo preliminar, que buscou esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na carcinogênese gástrica na população brasileira. Devemos sempre estar atentos à plausibilidade biológica de qualquer associação observada e à necessidade de replicação para validar o envolvimento dos *loci* possivelmente associados a uma doença, utilizando números amostrais independentes maiores e principalmente outras populações étnicas, de preferência mais homogêneas. E, no mesmo sentido, devemos continuar a investigação sobre o papel funcional desses polimorfismos e sua influência na biologia dos tumores gástricos. Esses resultados nos fornecem evidências sobre a importância desses genes e do processo inflamatório no contexto da carcinogênese gástrica e também nos auxilia a direcionar novos estudos funcionais para melhor caracterizar seus possíveis papéis e os mecanismos pelos quais atuam na doença.

5.7 GENES SELECIONADOS PARA O ESTUDO

5.7.1 *COX-2/PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)*

COX-2 está intimamente associada a processos inflamatórios, mediando à conversão de ácido aracdônico em PGH₂ e, por essa razão existe um grande interesse em estudar seu papel nos diversos estágios de desenvolvimento e progressão tumoral, especialmente no câncer gástrico (Zhang et al, 2005). COX-2 é uma enzima pró-inflamatória e níveis aumentados de sua expressão já foram observados na infecção por *H. pylori*, nos tumores gástricos e em suas lesões precursoras, demonstrando seu possível envolvimento desde estágios iniciais da carcinogênese (Thiel et al, 2011).

Em nosso estudo, foram escolhidos dois polimorfismos do gene *COX-2* para investigação: rs689466 e rs5275, localizados na região promotora e 3'-UTR, respectivamente. Eles parecem ter significado funcional, afetando a regulação da expressão gênica de *COX-2* e, conseqüentemente, o nível de resposta inflamatória, contribuindo para a variação individual na suscetibilidade ao câncer (Zhang et al, 2005).

De maneira resumida, os polimorfismos de *COX-2* não foram associados à suscetibilidade e nem foram capazes de prever o prognóstico do câncer gástrico em nosso estudo. Duas metanálises, uma incluindo 47 e a outra 58 estudos caso-controle, identificaram que o polimorfismo rs689466 foi associado a um risco aumentado para o câncer, principalmente para aqueles de sistema digestivo (Dong et al, 2010; Wang et al, 2015).

Embora o genótipo AG do polimorfismo rs689466 tenha sido associado à presença de invasão linfática, ele perdeu a significância quando ajustado em modelo de regressão logística. Uma amostra com um número maior de casos seria necessária para confirmar tal associação. Já foi descrito que a utilização de etodolac, um inibidor de COX-2 foi capaz de diminuir a formação de vasos linfáticos e, conseqüentemente suprimir a metástase linfonodal (Iwata et al, 2007). Além disso, a superexpressão de COX-2 foi associada a maior invasão linfática e metástase no câncer gástrico (Murata et al, 1999) e essa maior linfangiogênese e invasão linfática provavelmente se devem à superexpressão de VEGFA mediada por COX-2 (Da et al, 2008), mostrando a relevância em estudar diferentes genes dentro de uma mesma via relacionada em estudos de associação.

Zhang et al demonstraram que o fator de transcrição c-MYB reconhece um sítio de ligação na região promotora que contem o alelo selvagem A desse polimorfismo, aumentando os níveis de transcrição nos indivíduos portadores desse alelo (Zhang et al, 2005). Porém, o efeito funcional desse polimorfismo ainda deve ser melhor investigado, visto que um outro grupo demonstrou que o alelo G apresentou maior atividade transcricional em três linhagens de hepatócitos *in vitro* em relação ao alelo A (Sakaki et al, 2010).

Inúmeros estudos associam a maior expressão de COX-2 a características anatomopatológicas relacionadas à pior progressão da doença (Li et al, 2006; Da et al, 2008).

Nós detectamos uma associação entre o alelo G de rs689466 e o subtipo histológico intestinal de Lauren. Na análise de haplótipos, foi observado que o haplótipo GT, que apareceu em 17,4% da amostra e inclui o alelo polimórfico de rs689466 e o alelo selvagem de rs5275, apresentou-se mais frequente no grupo de indivíduos com subtipo histológico intestinal. Essa associação provavelmente foi devida à associação observada entre o alelo G do polimorfismo rs689466 e essa variável, na análise individual. Um estudo prévio detectou que a expressão de COX-2 foi mais frequente no subtipo intestinal do que no difuso (Joo et al, 2002).

Embora ambos os polimorfismos não tenham sido associado à sobrevida global e livre de doença em nosso estudo, Lurje et al demonstraram que o alelo C de rs5275 foi associado a um melhor prognóstico em câncer colorretal, com maior tempo de sobrevida livre de doença (Lurje et al, 2008). Nosso estudo detectou que a presença desse mesmo alelo foi associada a uma menor profundidade de invasão (t1+t2) e a uma menor presença de invasão perineural, na amostra total e à menor desmoplasia e menor presença de invasão perineural quando a amostra foi estratificada para casos com subtipo histológico difuso. Esses resultados sugerem que esse alelo estaria atuando como um fator capaz de predizer uma melhor progressão da doença.

Embora localizado em região 3'-UTR do gene, que não é codificada na proteína final, esse polimorfismo aparece em um sítio que possui regulação pelo microRNA 542-3p (Moore et al, 2012). Atualmente, a função de microRNAs como reguladores pós-transcricionais é bem descrita na literatura, sendo capazes de promover a diminuição da expressão gênica por meio da ligação e degradação de RNAm alvos (Kong et al, 2012). Embora tenha sido descrito que o alelo T crie um sítio de ligação para o miR542-3p

promovendo sua degradação (Moore et al, 2012) e consequente diminuição de expressão, nosso estudo detectou que o alelo C foi associado a uma melhor progressão no câncer gástrico.

É importante lembrar, entretanto, que a regulação da expressão de um gene é complexa e pode ser mediada por diversos fatores simultaneamente. Um estudo recente apresentou um catálogo das principais variações na região promotora de *COX-2* que alteram sítios de ligação a fatores de transcrição específicos. Esse dado é extremamente relevante visto que *COX-2* é uma enzima não constitucionalmente expressa e que pode ser induzida por estímulos inflamatórios específicos (Agundez et al, 2014).

Além disso, visto que *COX-2* pode ser inibida farmacologicamente e que esses inibidores potencialmente podem ser utilizados na prevenção e tratamento do câncer, é de grande importância investigar a influência desses polimorfismos frente a regimes de tratamentos específicos.

5.7.2 *OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1)*

OGG1 é uma DNA glicosilase pertencente à via BER (reparo por excisão de base), que repara preferencialmente lesões endógenas/oxidativas resultantes do metabolismo celular (Palli et al, 2010). Levantamos a hipótese de que polimorfismos funcionais em genes de reparo pudessem influenciar na capacidade de o hospedeiro lidar com reparo de danos ao DNA, causados por carcinógenos da dieta, estresse oxidativo e inflamação induzida pela infecção por *H. pylori*, presentes na carcinogênese gástrica. Acredita-se que, além de participar da maquinaria de reparo de DNA, *OGG1* também atue como importante modulador no sistema imune e inflamatório (Mabley et al, 2005) e, portanto, pareceu interessante selecioná-lo como um gene candidato para nosso estudo.

Investigamos o polimorfismo rs1052133 localizado no éxon 7, que resulta na troca de uma Ser por uma Cis na posição 326 da proteína (Ser326Cis). O mecanismo molecular pelo qual esse polimorfismo tem sido associado a diversos tipos de câncer foi demonstrado pelo aumento de instabilidade genética e diminuição na taxa de reparo de 8-oxoguanina *in vivo* causada pela variante Cis (Bravard et al, 2009). Porém, nossas análises de predição *in silico* demonstraram que essa troca de aminoácido é provável de ser benigna/tolerável para a proteína final.

Nosso estudo não detectou associação do polimorfismo com suscetibilidade ao câncer gástrico, corroborando dados de outro estudo que investigou uma amostra da população brasileira (Hanaoka et al, 2001). Possivelmente, outros genes pertencentes à mesma via de reparo poderiam compensar o reparo das lesões resultantes do estresse a que a mucosa gástrica está exposta durante etapas iniciais do desenvolvimento da doença.

Porém, uma vez que a doença tenha sido estabelecida, esse polimorfismo parece adquirir um papel importante, visto que o genótipo GG (variante Cis) foi associado com presença de desmoplasia moderada à intensa e de invasão perineural, fatores associados a uma pior progressão da doença. Não foram encontrados trabalhos na literatura associando-o com essas variáveis, mas uma metanálise recente demonstrou que a invasão perineural é um importante marcador da capacidade de invasão das células cancerosas, apresentando-se como fator de prognóstico independente para sobrevida em pacientes que foram submetidos à ressecção gástrica (Deng et al, 2014). Em nossas análises, esse polimorfismo também não foi associado às curvas de sobrevida global ou livre de doença.

Nesse sentido, mais estudos são necessários para elucidar o possível papel de OGG1 na inflamação e o significado funcional do polimorfismo rs1052133 para pior progressão do câncer gástrico.

5.7.3 *TNF (Tumor necrosis factor): TNFA e TNFB*

Devido ao papel bem documentado sobre a desregulação da expressão de citocinas pró- ou anti-inflamatórias chaves em lesões inflamatórias e em tumores malignos, existe um grande interesse em determinar se o perfil de genes pertencentes à família das citocinas poderia causar uma alteração qualitativa ou quantitativa da resposta inflamatória, mediando a predisposição a doenças cuja resposta imunológica seja importante, ou influenciando o seu curso clínico (Howell et al, 2002).

Como existe uma relação bem estabelecida entre um microambiente pró-inflamatório e a carcinogênese (Lu et al, 2006) e que o câncer gástrico possivelmente origine-se a partir da manutenção de uma inflamação crônica (Wu et al, 2005), selecionamos para o nosso estudo os polimorfismos rs909253 em *TNFB* e rs1800629

em *TNFA*, que são genes codificados pelo mesmo *cluster*, localizados em *tandem* dentro do MHC de classe III no cromossomo 6 (Makhatadze, 1998).

Ambos os polimorfismos não atuaram como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico em nossas análises. Resultados similares foram descritos em estudo caso-controle conduzido em uma amostra independente da população brasileira (São José do Rio Preto/SP), com número amostral similar ao nosso (de Oliveira et al, 2013). Além disso, os haplótipos compostos pelos polimorfismos desses genes também não foram associados à doença e não corroboraram resultados prévios, que detectaram que o haplótipo AG foi associado ao risco cerca de quatro vezes maior para o câncer gástrico (Partida-Rodriguez et al, 2010).

Embora o alelo G não tenha sido associado à suscetibilidade ao câncer gástrico em nossa amostra, um estudo demonstrou que ele possui um efeito protetor contra o desenvolvimento dessa doença, de uma maneira dose-dependente (Partida-Rodriguez et al, 2010). Esses resultados são condizentes com um estudo prévio que associou o outro alelo (A) com níveis aumentados de transcrito e proteína de TNFB (Messer et al, 1991), que poderiam expor a mucosa gástrica a maior dano celular.

Considerando-se os casos com subtipo histológico difuso, detectamos associação entre o alelo polimórfico G e uma maior presença de infiltrado inflamatório, além de menor presença de metástase linfonodal e metástase à distância e maiores tempos de sobrevida global e livre de doença. Embora não tenhamos caracterizado quais os tipos celulares presentes nesse infiltrado inflamatório e que nossos dados sejam qualitativos, eles nos trazem indícios de um possível papel desse polimorfismo na resposta imunológica no microambiente gástrico, promovendo uma melhor progressão e prognóstico da doença para esses pacientes.

É interessante observar que essa associação não foi detectada na amostra total do estudo, evidenciando a importância de avaliar subtipos histológicos com diferentes etiologias separadamente. Associações relevantes podem ser perdidas quando subtipos com diferentes etiologias são analisados conjuntamente, uma vez que serão diluídas na amostra total. Já é bem escrito na literatura que os subtipos intestinal e difuso apresentam etiologias e vias carcinogênicas distintas, possuem mecanismos específicos de comunicação entre as células tumorais e estromais e, portanto, diferentes padrões de crescimento celular, apoptose, angiogênese, morfogênese, progressão e metástase (Tahara, 2004).

García-González, MA et al (2012) demonstraram que esses polimorfismos de TNF não foram associados com a sobrevida global do câncer gástrico em população espanhola, considerando a amostra total e estratificada para os diferentes subtipos histológicos. Porém, portadores do alelo G do polimorfismo rs909253 apresentaram uma tendência a predizer um melhor prognóstico, com valores de *HR* de 0,83 (IC 95% 0,67-1,05) na amostra total (Garcia-Gonzalez et al, 2012). Em nosso estudo, os valores de *HR* variaram de 0,27 a 0,59 na amostra total e de 0,32 a 0,60 nos casos com subtipo histológico difuso em análise multivariada, considerando-se todos os modelos genéticos avaliados.

As citocinas agem em células alvo e se ligam a receptores específicos, iniciando a transdução de sinal e vias de segundos mensageiros dentro de uma célula alvo. Elas atuam em redes complexas altamente coordenadas, e essa complexidade muitas vezes resulta na sobreposição entre funções de citocinas individuais, que em conjunto irão resultar nas respostas imunes pró ou anti-inflamatórias (Howell et al, 2002). Essas funções redundantes indicam que esses polimorfismos não atuam individualmente e nem são os únicos responsáveis por alterarem a suscetibilidade, progressão e prognóstico da doença. Desta forma, é muito importante o estudo de mais marcadores simultaneamente e em diferentes contextos dentro do mesmo fenótipo, auxiliando-nos a entender os componentes multifatoriais dos processos inflamatórios.

5.7.4 HSP70 (*Heat shock 70kDa protein*): HSPA1B e HSPA1L

As HSPs de mamíferos são classificadas em seis famílias de acordo com seu peso molecular. Entre elas, HSP70 é a família de proteínas de estresse mais conservada e bem caracterizada e compreende três genes principais, localizados na região do MHC classe III que codificam para as proteínas HSPA1A, HSPA1B e HSPA1L (He et al, 2014). Os polimorfismos selecionados por nosso estudo foram o rs2227956 do gene *HSPA1L* e o rs1061581 do gene *HSPA1B*.

O polimorfismo rs2227956 de *HSPA1L* ocasiona a troca de um aminoácido hidrofóbico e não polar (Met) por um polar e neutro (Thr) em um domínio de ligação a peptídeo, podendo alterar essa especificidade de ligação e, consequentemente a sua função biológica (Rippmann et al, 1991). Porém, a análise de predição *in silico* que

realizamos pelos *softwares* Polyphen2 e SIFT demonstrou que essa troca de aminoácidos é tolerada/benigna.

Ele já foi descrito com um possível papel de proteção, visto que foi previamente descrito como protetor contra o risco de desenvolvimento de câncer gástrico (Ferrer-Ferrer et al, 2013). Embora não tenhamos detectado associação com diminuição do risco para o câncer gástrico e nem com prognóstico, quando avaliamos os dados anatomopatológicos, observamos que o alelo C foi capaz de predizer menor presença de invasão perineural e desmoplasia, sugerindo atuar como uma variante de menor agressividade ou progressão da doença em nossa amostra.

Ainda não se sabe muito sobre o papel funcional do polimorfismo rs1061581 de *HSPA1B*, visto que acarreta em uma substituição silenciosa. Em nossa amostra, essa variante não foi capaz de predizer risco, progressão e nem prognóstico da doença. Na literatura, ela foi descrita como capaz de regular a expressão da proteína interferindo com a estrutura secundária e estabilidade do RNAm (Schroeder et al, 1999; Wu et al, 2004), afetando seu efeito anti-apoptótico e sua função como moduladora do sistema imune. Uma metanálise demonstrou que o alelo G foi associado ao risco aumentado quando considerado todos os tipos de câncer, porém quando estratificado para o câncer gástrico o resultado observado foi o oposto, com o genótipo GG apresentando proteção para a doença (Kuang et al, 2014). Porém, já foi anteriormente descrito que os homozigotos AA apresentaram um menor nível proteico após indução por choque térmico em relação aos outros genótipos (Pociot et al, 1993).

É descrito que as proteínas HSP70 parecem estar associadas a um papel citoprotetor da mucosa gástrica contra inúmeros danos, por exemplo, os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Leung et al, 2015), que é a mesma situação ao qual o epitélio gástrico é exposto em um microambiente inflamatório. Porém, as funções das HSP70 precisam ser melhor investigadas, visto que embora tenham primariamente um papel protetor, a superexpressão da proteína já foi previamente associada à fatores de pior progressão no câncer gástrico, como estadiamento mais avançado no subtipo intestinal (Lee et al, 2013), tamanho do tumor, profundidade de invasão e acometimento linfonodal (Canoz et al, 2002).

Em relação às análises de haplótipos, não observamos associação entre os haplótipos formados por *HSP70* com a suscetibilidade ao câncer gástrico. Dados

prévios de outro grupo também não observaram associação entre os haplótipos formados por esses polimorfismos e o câncer gástrico (Partida-Rodriguez et al, 2010).

Desta forma, ainda é preciso investigar melhor o papel funcional desses polimorfismos e seu potencial envolvimento na carcinogênese gástrica.

5.7.5 VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*)

Os polimorfismos do gene *VEGFA* selecionados para o nosso estudo foram: rs699947 e rs833061 (localizados na região promotora), rs2010963 (localizado na região 5'-UTR) e rs3025039 (localizado na 3'-UTR).

O polimorfismo rs699947 foi capaz de predizer proteção ao câncer gástrico em modelo multivariado, após ajuste para variáveis de confusão, diminuindo o risco de desenvolver a doença em cerca de 50% nos diferentes modelos genéticos avaliados. Essa associação não foi mantida quando a amostra foi estratificada somente para os casos com subtipo histológico difuso.

Os demais polimorfismos não foram associados com a suscetibilidade ao câncer gástrico em nosso estudo. Entretanto, reforçando a ideia de que estudos de haplótipos geralmente são mais informativos do que estudos envolvendo SNPs individuais (Radovich et al, 2010), detectamos associação significativa entre o haplótipo CTC e o câncer gástrico. Esse haplótipo é formado pelos alelos selvagens dos polimorfismos rs699947 e rs833061, e pelo alelo polimórfico do rs2010963, e apresentou maior frequência em pacientes (37,5%) do que em controles (28,6%).

A frequência do haplótipo CTC em nossa amostra foi de 32,4%. Em um estudo anterior, que construiu grandes blocos haplotípicos com diversos polimorfismos da região promotora de *VEGFA*, o bloco que incluiu esses mesmos alelos apareceu com frequência de 19,8% e 12,5% em caucasianos e afro-americanos, respectivamente (Radovich et al, 2010). Além disso, nosso estudo também observou que os haplótipos ATG e CCC de *VEGFA* apresentaram associação significativa com o câncer gástrico, aparecendo com maior frequência em controles do que em casos. Porém, a relevância clínica desse resultado é pequena, visto que as frequências desses haplótipos na amostra estudada foram muito baixas, de 4,7 e 3,2%, respectivamente.

O polimorfismo rs3025039 não se apresentou em desequilíbrio de ligação com os outros três polimorfismos selecionados em nosso estudo, corroborando um estudo de

associação prévio na população brasileira (Perini et al, 2014), possivelmente porque a sua localização mais distante (região 3'-UTR) o predispõe a eventos de recombinação homóloga. Porém, a associação desses polimorfismos com o câncer gástrico, individualmente ou em haplótipos, precisa ser confirmada, visto que os dados na literatura ainda são inconclusivos e conflitantes (Ke et al, 2008; Liu et al, 2011; Zhou et al, 2011).

Em relação aos dados anatomopatológicos, os alelos polimórficos de rs699947 e rs833061 foram associados à presença de invasão sanguínea. VEGFA possui um papel muito bem estabelecido na angiogênese, participando de vias de sinalização que levam ao aumento da permeabilidade, proliferação e crescimento de células endoteliais, migração celular e diferenciação em vasos sanguíneos maduros (Eng, Liu, 2013). Como esses polimorfismos estão em região promotora, possivelmente influenciam na expressão de VEGF circulante, que por sua vez poderiam modular a formação de novos vasos, facilitando a disseminação das células tumorais para outras regiões do corpo. Essa associação foi mantida quando a amostra foi estratificada para os casos com subtipo histológico difuso. O genótipo AC do polimorfismo rs699947 já foi previamente associado à metástase hematogênica (Scartozzi et al, 2012). Além de ser capaz de prever a invasão sanguínea, o polimorfismo rs833061 também foi associado a um maior tamanho de tumor (maior que 5 cm).

O haplótipo ACG foi associado à invasão sanguínea e esse resultado provavelmente é decorrente da presença dos dois alelos que foram associados individualmente com essa característica. Esse é um exemplo clássico de polimorfismos que se encontram em desequilíbrio de ligação e são associados a uma mesma variável, não sendo possível discernir se somente um deles ou ambos são responsáveis pela associação observada. Para tanto, análises funcionais, avaliando cada um separadamente seriam necessárias para inferir qual deles acarreta na associação observada.

A presença de invasão sanguínea *per se* demonstra ser um fator independente de pior progressão e agressividade na nossa amostra, apresentando associação com tumores com tamanho maior que 5 cm ($p=0,041$), maior profundidade de invasão (t3+t4; $p<0,001$), presença de invasão perineural ($p<0,001$), invasão linfática ($p<0,001$), metástase linfonodal ($p<0,001$), metástase à distância ($p=0,024$) e estadiamento mais avançado (III+IV) ao diagnóstico ($p<0,001$) (dados não mostrados).

Outro polimorfismo investigado nesse estudo, rs2010963 (localizado em 5'-UTR), foi associado à metástase linfonodal e invasão de outros órgãos, fatores também associados a uma pior progressão da doença. Um estudo anterior também demonstrou associação entre o genótipo CC e a presença de metástase linfonodal, além de um tumor mais indiferenciado (Al-Moundhri et al, 2009). Além disso, em um estudo com câncer de mama, esse polimorfismo foi associado com aumento do risco para a doença, maiores níveis de RNAm de *VEGFA*, tumor de maior tamanho, invasão perineural, estadio II-IV e menor sobrevida livre de doença, todos fatores associados a uma maior agressividade do tumor (Sa-Nguanraksa et al, 2013).

O haplótipo CTC (que também confere maior suscetibilidade em desenvolver o câncer gástrico) apresentou associação com invasão de outros órgãos, possivelmente por causa da presença do alelo C do polimorfismo rs2010963, também associado individualmente a essa variável. Esse resultado deve ser cautelosamente analisado, levando em consideração as baixas frequências observadas em nossa amostra tanto do haplótipo em questão (38,2%) quanto da presença de invasão para outros órgãos (3,4%).

Por outro lado, o genótipo TT do polimorfismo rs3025039, localizado na região 3'-UTR, foi associado a uma menor profundidade de invasão e um melhor estadiamento (I+II) ao diagnóstico. Visto que parece existir uma relação direta entre uma maior expressão de *VEGFA* e um pior prognóstico no câncer gástrico (Lieto et al, 2008; Liu et al, 2012), é plausível que esse polimorfismo esteja associado a uma melhor progressão da doença, já que resultados anteriores mostraram que esse alelo diminuiu a produção de *VEGFA* (Renner et al, 2000; Krippel et al, 2003).

Nosso estudo não detectou associação entre os polimorfismos de *VEGFA* e sobrevida global ou livre de doença. Um estudo que investigou três desses polimorfismos (rs833061, rs2010963 e rs3025039) não detectou associação com prognóstico (Guan et al, 2009), porém outro estudo identificou rs3025039 como fator de pior prognóstico, com diminuição do tempo de sobrevida global (Kim et al, 2007).

Desta forma, os resultados preliminares do nosso estudo indicam que os polimorfismos rs699947, rs833061 e rs2010963 poderiam ser utilizados com marcadores de pior progressão e o polimorfismo rs3025039 como de melhor progressão no câncer gástrico. Porém, o papel funcional desses polimorfismos precisa ser melhor esclarecido e nossos achados necessitam ser validados em outras populações.

5.7.6 *IL17F (Interleukin 17F)*

Em nosso estudo, o polimorfismo rs763780 do gene *IL17F* foi associado ao câncer gástrico no Modelo de Alelos. Porém, essa associação foi perdida quando incluída em modelo multivariado, ajustado para as covariáveis de confusão. Esse resultado poderia representar um falso-positivo, uma vez que não foi confirmado pelos outros modelos genéticos testados, além de a frequência do alelo polimórfico ser muito baixa em nossa amostra (8,4% e 4,8% no grupo de casos e controles, respectivamente). Para confirmar o seu risco em predispor ao desenvolvimento do câncer gástrico com poder estatístico confiável, seria necessário reavaliá-lo em uma amostra independente e com número amostral bem maior. Além disso, esse polimorfismo apresentou desvios do EHW e também não foi associado às características anatomopatológicas e nem ao prognóstico do câncer gástrico nesse estudo.

O polimorfismo rs763780 causa uma substituição de His por Arg no aminoácido 161. Em análise de predição pelos *softwares* Polyphen2 e SIFT, a substituição do aminoácido de His para Arg na proteína final é considerada como benigna/tolerada. Análises *in vitro* demonstraram que a variante polimórfica perde a capacidade de ativar a via de proteína quinase ativada por mitógeno, de produzir citocinas e quimicinas em células epiteliais bronquiolares, além de bloquear a indução de IL-8 (Kawaguchi et al, 2006).

Estudo prévio verificou a associação entre a presença do alelo G e o aumento do risco para o desenvolvimento do câncer gástrico e a algumas variáveis clinicopatológicas, como localização, subtipo histológico, diferenciação tumoral, estadiamento TNM e idade de acometimento (Wu et al, 2010). Nesse mesmo estudo, o genótipo GA foi também associado com tumores de maior tamanho e com presença de metástase linfonodal (Wu et al, 2010).

IL17F faz parte de uma família de citocinas com importante papel imunoregulador. Membros dessa família estão associados a doenças inflamatórias e são capazes de induzir uma série de citocinas e quimiocinas cruciais para a regulação da resposta inflamatória (Kawaguchi et al, 2004). Uma possível explicação pela qual esse estudo não detectou associação entre o polimorfismo de *IL17F* e a progressão e prognóstico da doença é que, como citado anteriormente, as citocinas fazem parte de vias com sobreposição de funções e, portanto, a função comprometida de um membro

pode ser compensada por outros que fazem parte da mesma via. Portanto, não podemos excluir a hipótese de que o polimorfismo esteja associado a alguma possível alteração funcional.

5.7.7 LGALS3 (*Lectin, galactoside-binding, soluble, 3*)

Tendo a inflamação como foco do nosso estudo, escolhemos investigar o gene *LGALS3*, visto que seu produto funcional possui papel já bem estabelecido em diversos processos inflamatórios. GAL-3 demonstrou ser capaz de induzir a produção de IL-2 por células T, promovendo um estado pró-inflamatório (Liu, 2005). Ela também demonstrou estar envolvida em uma variedade de processos durante as respostas inflamatórias agudas, como ativação e adesão de neutrófilos, quimioatração de monócitos e macrófagos e ativação de mastócitos (Henderson, Sethi, 2009). Além disso, os macrófagos são descritos por expressar e secretar altos níveis de GAL-3 (Liu, 2005).

Um estudo recente descreveu um papel pró-inflamatório de GAL-3 frente à infecção por *H. pylori*, levando à indução de uma maior atividade proliferativa e anti-apoptótica nas células infectadas, podendo gerar um dano celular crônico por meio da persistência desse estado inflamatório (Subhash, Ho, 2016).

O polimorfismo rs4644 analisado em *LGALS3*, Pro64His, é uma substituição não-sinônima que altera o padrão de clivagem por MMPs. A proteína com a variante His (alelo A) é preferencialmente clivada por MMP-2 e 9, enquanto que a forma da proteína com Pro é resistente a essa clivagem (Nangia-Makker et al, 2007). Essa substituição de Pro por His no códon 64 da proteína demonstrou ser possivelmente patogênica e deletéria por predição *in silico* realizada pelos *softwares* Polyphen-2 e SIFT. Em nosso estudo não houve associação desse polimorfismo com suscetibilidade para o desenvolvimento do câncer gástrico, porém o alelo A já foi previamente associado ao risco aumentado para o câncer de mama (Balan et al, 2008).

Estudos funcionais demonstraram que a presença desse polimorfismo é importante para a aquisição de um fenótipo mais agressivo das células tumorais, indicando que a clivagem de GAL-3 está associada à progressão tumoral, demonstrado por uma maior quimiotaxia, invasão, interação com células endoteliais e angiogênese quando comparada com a forma não clivável (Nangia-Makker et al, 2010). Outro estudo demonstrou que linhagens celulares de câncer gástrico contendo a forma clivada e mais

ativa de GAL-3 proliferaram mais e tiveram maior acúmulo de GAL-3 e β -catenina no núcleo, cuja interação já foi previamente associada ao favorecimento da tumorigênese (Kim et al, 2011).

Nosso estudo detectou que, embora não estivesse envolvida com a suscetibilidade ao tumor, GAL-3 parece ter papel importante na sua progressão. Observamos uma associação de portadores do alelo polimórfico A (His) com uma menor idade de acometimento ao diagnóstico e maior prevalência de desmoplasia moderada à intensa. Além disso, também observamos uma tendência de associação entre o genótipo AA e invasão linfática ($p=0,052$; dados não apresentados). Esses fatores estão associados a uma pior progressão da doença, corroborando dados anteriores que também demonstraram que o alelo A estava associado a uma pior evolução do câncer gástrico (Nangia-Makker et al, 2010; Kim et al, 2011). Quando estratificada para a amostra de casos com subtipo histológico difuso, a associação com desmoplasia não foi observada, mas indivíduos portadores desse alelo mantiveram associação com menor idade ao diagnóstico.

Não sabemos de que maneira a forma clivada de GAL-3 por MMPs poderia estar associada a uma maior desmoplasia no tumor, mas poderia ser decorrente da alteração das interações celulares e remodelação da matriz extracelular, funções intimamente relacionadas à GAL-3 e MMPs (Nangia-Makker et al, 2010). No microambiente tumoral talvez não seja possível dissociar as funções de ambas as moléculas, uma vez que a clivagem dessa variante de GAL-3 secretada para a matriz extracelular seria dependente da presença de MMPs. As MMPs estão associadas a um fenótipo mais maligno e geralmente apresentam-se superexpressas no microambiente tumoral (Nelson et al, 2000), mas não sabemos se poderiam atuar como um fator limitante para a clivagem de GAL-3. No mesmo sentido, a clivagem de GAL-3 poderia ser um indicativo de atividade de MMPs nesse microambiente.

As análises das curvas de Kaplan-Meier evidenciaram um possível papel de GAL-3 no prognóstico desses pacientes, demonstrando associação entre a presença do alelo His e um menor tempo de sobrevida livre de doença. Embora a associação tenha sido perdida em análise multivariada após ajuste para as variáveis de confusão, esses dados podem nos indicar um possível papel de GAL-3 na sobrevida desses pacientes.

Embora maiores níveis de GAL-3 já tenham sido observados em soro de pacientes com câncer gástrico e associados à metástase linfonodal e à distância (Cheng

et al, 2015), os resultados apresentados e discutidos aqui nos levam a crer que a presença desse polimorfismo poderia direcionar a progressão do tumor para um fenótipo mais maligno, independente de uma alteração da expressão de GAL-3. Isso poderia em parte explicar porque não existe concordância nos níveis de GAL-3 detectados em diferentes estudos com tumores gástrico, por exemplo (Baldus et al, 2000; Miyazaki et al, 2002; Okada et al, 2006). Em estudo prévio do nosso grupo, foi observada uma redução da expressão de GAL-3 em tecidos tumorais gástricos e uma associação entre a menor expressão e a presença de metástase à distância (Leal et al, 2014).

Nesse sentido, seria necessária a utilização de marcadores capazes de distinguir as formas cliváveis ou não de GAL-3 no tecido tumoral, a fim de melhor entender o seu papel e do polimorfismo rs4644 no câncer gástrico. Além disso, a localização da marcação de GAL-3 também deve ser levada em consideração, visto que a sua clivagem ocorre no meio extracelular e, portanto, ela precisaria ser secretada pela célula.

No momento, nosso grupo de pesquisa está avaliando o padrão de marcação para as formas específicas clivadas e não clivadas de GAL-3 nos cortes histológicos dos mesmos tumores avaliados nesse estudo. As expressões serão posteriormente associadas aos genótipos dos respectivos pacientes e também às variáveis anatomopatológicas e sobrevida global e livre de doença.

5.7.8 *PHB (Prohibitin)*

Embora estudos tenham descrito um papel funcional para o polimorfismo rs6917, localizado na região 3'-UTR do gene *PHB* (Manjeshwar et al, 2003) e que ele já tenha sido associado ao risco aumentado para o desenvolvimento de alguns tipos de tumores (Jupe et al, 2001) (Zhou et al, 2012), no presente estudo não foi identificada associação com a suscetibilidade ao câncer gástrico.

Um estudo anterior realizado por nosso grupo demonstrou o possível papel desse polimorfismo na regulação transcricional de *PHB* no câncer gástrico, uma vez que o alelo polimórfico T foi associado a níveis reduzidos do transcrito de *PHB* e, por sua vez, os menores níveis de expressão do transcrito foram associados à menor invasão, ausência de metástase linfonodal e estágios mais precoces do câncer gástrico, sugerindo uma diminuição na regulação de *PHB* na iniciação do tumor (Leal et al, 2014).

Mesmo não havendo associação desse polimorfismo com suscetibilidade, progressão e prognóstico da doença na amostra avaliada no presente estudo, não podemos descartar o potencial papel funcional do alelo polimórfico T, observada em nosso estudo anterior. É importante ressaltar que, embora tenha demonstrado um potencial envolvimento de *PHB* no câncer gástrico, nosso estudo anterior não era um estudo de associação, bem como o estudo atual não avaliou expressão do transcrito de *PHB*. Pensando no câncer gástrico como uma doença multifatorial, podem existir outros mecanismos ambientais ou genéticos compensando a função de *PHB*.

Além disso, as amostras da população brasileira utilizadas foram oriundas de diferentes regiões do Brasil, com diferentes *backgrounds* genéticos e/ou fatores de risco associados. O estudo anterior utilizou amostras provenientes da região Norte do Brasil (Pará), enquanto nosso estudo atual utilizou amostras provenientes da região Sudeste (São Paulo). Os indivíduos estão submetidos a fatores de exposição ambientais diferentes, principalmente os relacionados à dieta.

Embora com etiologias diferentes, em trabalho prévio também publicado pelo nosso grupo, esse polimorfismo conferiu maior risco para desenvolvimento de melanoma na presença de fatores específicos de risco do hospedeiro (Francisco et al, 2013). Visto isso, atualmente temos conduzido em nosso laboratório estudos em linhagens de melanoma humano buscando investigar o papel funcional desse polimorfismo na resistência a diferentes quimioterapias.

Nesse sentido, devemos continuar a conduzir novos estudos na tentativa de esclarecer o papel do polimorfismo funcional de 3'-UTR do gene *PHB* na carcinogênese gástrica e de outros tumores.

5.7.9 *TP53* (Tumor protein p53)

TP53 codifica para uma proteína nuclear, que atua como fator de transcrição com papel na manutenção da estabilidade genética, regulando a expressão de centenas de genes. Ele é conhecido como “guardião do genoma” e permanece como o gene cujas alterações genéticas são as mais prevalentes na etiologia do câncer, sendo atribuído a ele funções como parada no ciclo celular, reparo de DNA, apoptose, senescência, metabolismo de DNA, angiogênese, diferenciação celular, resposta imune, dentre outras (Bellini et al, 2012).

Nosso estudo incluiu a investigação de duas variantes do gene *TP53*, o polimorfismo rs1042522 localizado no éxon 4, que ocasiona a substituição do aminoácido Arg por Pro e a mutação rs121912664 que troca uma Arg por His no éxon 10. Análises de predição *in silico* demonstraram que a alteração do aminoácido pela presença do polimorfismo é provavelmente benigna/tolerável para a proteína, porém a mutação é possivelmente deletéria/patogênica.

Na nossa amostra total de 262 controles e 178 casos, o polimorfismo rs1042522 foi associado a um risco aumentado em cerca de duas vezes para o desenvolvimento do câncer gástrico. Esse risco foi ainda mais evidente (cerca de três vezes) quando considerado somente os casos com o subtipo histológico difuso. Embora um risco maior tenha sido observado nos casos com subtipo difuso, a suscetibilidade aumentada para desenvolver o câncer gástrico não parece ser exclusiva desse subgrupo, uma vez que também foi observada na amostra total. Essas associações foram significativas nos Modelos de Genótipos, Alelos e Dominante, mesmo após correção para covariáveis de ajuste. O resultado obtido pelos diferentes modelos genéticos reforça a associação encontrada.

A IARC (*International Agency for Research on Cancer*) possui um banco de dados de variações genéticas em *TP53* (disponível em www-p53.iarc.fr), que inclui todas as alterações catalogadas para esse gene, descritas desde 1989, com informações detalhadas sobre o impacto funcional, as características anatomopatológicas dos tumores e dados demográficos, de estilo de vida e história familiar dos pacientes analisados. Também é possível visualizar alterações na estrutura tridimensional da proteína ocasionadas pelas variações genéticas.

Uma possível explicação para a associação encontrada entre o alelo C (variante Pro) e a suscetibilidade ao câncer pode ser apresentada com base nas alterações funcionais descritas na literatura. A proteína contendo a variante Arg mostrou uma maior eficiência em induzir a apoptose do que a variante Pro, devido a sua maior capacidade em interagir com MDM2, ser exportada do núcleo e translocar para a mitocôndria (Dumont et al, 2003). Além de induzir a apoptose, a variante Arg também foi capaz de reprimir a transformação de células primárias mais eficientemente do que a variante Pro (Thomas et al, 1999).

Por ser o polimorfismo mais estudado de *TP53*, inúmeras metanálises analisaram sua associação com o câncer gástrico (Tang et al, 2012; Xiang et al, 2012; Cheng et al, 2014), confirmando a relevância do mesmo para o risco aumentando para essa doença.

Uma metanálise realizada por nosso grupo identificou que esse polimorfismo foi associado a um risco aumentado para câncer gástrico em asiáticos (Francisco et al, 2011), indicando que a etnia poderia modular a penetrância desse polimorfismo na suscetibilidade ao câncer gástrico. Quando estratificado para localização anatômica e subtipo histológico, essa mesma metanálise identificou um risco aumentado para o câncer gástrico do tipo não-cárdia e para o subtipo histológico intestinal em populações asiáticas (Francisco et al, 2011). Em nosso presente estudo, o alelo polimórfico foi capaz de prever ao subtipo histológico difuso de Lauren, que também demonstrou pior progressão e prognóstico na nossa amostra. Esse fato pode ser devido à diferente composição populacional da nossa amostra, cuja etnia asiática é pouco frequente.

Além disso, também observamos que a presença do alelo Pro foi associada à desmoplasia moderada à intensa. Não foram encontrados dados prévios associando esse polimorfismo à desmoplasia, porém a literatura descreve que um estroma mais reativo está ligado a um pior prognóstico (Liu et al, 2012).

Também observamos que portadores do alelo Pro apresentaram uma idade mais precoce de acometimento ao diagnóstico. Um estudo brasileiro não detectou associação do polimorfismo de *TP53* com parâmetros clinicopatológicos, porém observou uma associação entre o genótipo Arg/Arg e acometimento mais tardio pela doença (>65 anos) (Neves Filho et al, 2012), que poderia novamente ser explicada pela melhor eficiência na indução de apoptose por essa variante (Pim, Banks, 2004), protegendo ou retardando o processo de malignização.

Embora tenhamos detectado que o polimorfismo rs1042522 foi capaz de prever suscetibilidade aumentada para o câncer gástrico, bem como foi associado a características anatomopatológicas de pior progressão da doença, ele não foi capaz de prever um pior prognóstico, não demonstrando associação com tempo de sobrevida global e livre de doença, corroborando dados prévios (Wang et al, 2013). Inúmeros estudos na literatura têm demonstrado a associação entre rs1042522 e um pior prognóstico em pacientes com câncer gástrico que receberam quimioterapia adjuvante após a cirurgia (Huang et al, 2008; Huang et al, 2009), porém esse não foi o foco do nosso estudo.

Um microambiente inflamatório pode iniciar o processo de carcinogênese e dirigir a progressão e metástase, sendo que a ativação correta de redes das quais p53 faz parte parece ter papel central na resposta causada por processos inflamatórios. Um trabalho demonstrou que frente a um estresse inflamatório, p53 apareceu como um dos genes que interage nas redes de resposta celular ao estresse causado pela inflamação, ativando ou reprimindo uma série de genes (Staib et al, 2005). Dessa forma, poderíamos pensar na atuação de p53 não somente com sua função clássica de supressor tumoral, mas também influenciando na carcinogênese gástrica como modulador da resposta imune dentro do contexto de inflamação crônica observada nessa doença.

Nosso estudo também buscou descrever a presença da mutação rs121912664 de *TP53* nessa amostra da população brasileira. Essa mutação tem sido associada a diferentes tipos de tumores e aparece com maior frequência na região Sul do Brasil (Assumpcao et al, 2008; Palmero et al, 2008; Borges, Ayres, 2015; Achatz, Zambetti, 2016), devido a um possível efeito fundador (Pinto et al, 2004; Garritano et al, 2010). No entanto, essa alteração não demonstrou ser relevante para a predisposição ao câncer gástrico na amostra avaliada nesse estudo, pois não foi detectada em nenhum indivíduo, em ambos os grupos.

Como discutido anteriormente, nosso estudo encontrou que o polimorfismo de *TP53* não se encontrou em EHW no grupo de controles. Esse é um fator que deve ser avaliado com cautela no momento de interpretar os resultados e que pode levar à heterogeneidade de resultados envolvendo *TP53* na literatura.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- As frequências genotípicas e alélicas dos quinze polimorfismos investigados em nossa amostra corresponderam às descritas em bancos de dados públicos;
- A mutação fundadora p.R337H de *TP53* não foi detectada em nenhum indivíduo em nossa amostra (em ambos os grupos de casos e controles);

Marcadores de suscetibilidade ao câncer gástrico (estudo caso-controle)

- rs1042522 (*TP53*) foi associado ao risco cerca de duas vezes maior para o desenvolvimento do câncer gástrico, sendo esse risco ainda maior (cerca de três vezes) considerando-se somente a amostra de casos com o subtipo difuso;
- rs699947 (*VEGFA*) foi associado com uma proteção para o câncer gástrico (amostra total);
- O haplótipo CTC (formado por rs699947, rs833061 e rs2010963 do gene *VEGFA*) foi associado à suscetibilidade ao câncer gástrico.

Marcadores de Progressão do câncer gástrico (características anatomopatológicas)

- rs689466 (*COX-2*); rs1052133 (*OGG1*); rs699947, rs833061 e rs2010963 (*VEGFA*); rs4644 (*LGALS3*) e rs1042522 (*TP53*) foram associados com características anatomopatológicas de pior progressão da doença;
- rs5275 (*COX-2*); rs2227956 (*HSPAIL*) e rs3025039 (*VEGFA*) foram associados com características anatomopatológicas de melhor progressão da doença;
- rs909253 (*TNFB*) foi associado com maior infiltração inflamatória e características de melhor progressão da doença somente nos casos com o subtipo difuso;
- Haplótipo GG (*TNFB/TNFA*) foi associado com invasão perineural; ACG (*VEGFA*) com invasão sanguínea; CTC (*VEGFA*) com invasão para outros órgãos; GT (rs689466 e rs5275 do gene *COX-2*) com subtipo histológico intestinal.

Marcadores de Prognóstico do câncer gástrico (sobrevida global e livre de doença)

- Tamanho do tumor, profundidade de invasão, presença de invasão sanguínea e linfática, presença de metástase linfonodal e à distância, estadiamento e subtipo histológico foram associados a um pior prognóstico (menor tempo de sobrevida global e livre de doença):

- rs909253 (*TNFB*) foi associado a um melhor prognóstico, com maior tempo de sobrevida global e livre de doença (na amostra total e nos casos com subtipo difuso);
- rs4644 (*LGALS3*) foi associado a um pior prognóstico, com menor tempo de sobrevida livre de doença (na amostra total).

Análises funcionais *in silico*

- rs1052133 (*OGGI*), rs2227956 (*HSPAIL*), rs763780 (*IL17F*) e rs1042522 (*TP53*) foram preditas como variantes genéticas benignas e/ou toleradas;
- rs4644 (*LGALS3*) e rs121912664 (*TP53*) foram preditas como variantes genéticas possivelmente patogênicas e/ou deletérias;
- Construção de rede biológica complexa incluindo os onze genes estudados demonstrou o papel desses genes dentro de um contexto mais sistêmico e integrativo.

ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

D A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 3671

SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/07/01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa n.º 222/01, intitulado: "Alterações genéticas do câncer de estômago e sua correlação com a clínica e patologia", apresentado pelo(a) pesquisador(a) Prof. Dr. Joaquim José Gama-Rodrigues, do Departamento de Gastroenterologia, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CAPPesq, 11 de julho de 2001.

p/ PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde n.º 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **04.09.14** tomou ciência dos documentos apresentados como atualizações do Projeto intitulado **“Alterações genéticas do câncer de estômago e sua correlação com a clínica e patologia”**, previamente aprovado pelos Comitês de Ética desta Instituição. Trata-se de estudo de variáveis moleculares com avaliação retrospectiva de banco de dados previamente constituídos. Para fins de pós-graduação a proposta terá como Pesquisador Responsável/Orientador - Prof. Dr. Roger Chammas e Pesquisador Executante/Orientanda - Tatiane Katsue Furuya Mazzotti, e por não haver nenhum óbice ético, **a proposta foi aprovada.**

CEP-FMUSP, 04 de Setembro de 2014.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achatz MI, Zambetti GP. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6.

Agundez JA, Gonzalez-Alvarez DL, Vega-Rodriguez MA, Botello E, Garcia-Martin E. Gene variants and haplotypes modifying transcription factor binding sites in the human cyclooxygenase 1 and 2 (PTGS1 and PTGS2) genes. *Curr Drug Metab* 2014;15: 182-95.

AJCC Cancer Staging manual. ed. New York: Springer; 2010

Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Burney IA, Al-Farsi AA, Al-Bahrani B. Gastric cancer risk predisposition and prognostic significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms--a case-control study in an Omani population. *Mol Carcinog* 2009;48: 1170-6.

Aprile G, Ongaro E, Del Re M, Lutrino SE, Bonotto M, Ferrari L, et al. Angiogenic inhibitors in gastric cancers and gastroesophageal junction carcinomas: A critical insight. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015.

Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, et al. Genetic polymorphisms of molecules associated with inflammation and immune response in Japanese subjects with functional dyspepsia. *Int J Mol Med* 2007;20: 717-23.

Assumpcao JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Zambetti GP, Ganti R, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer* 2008;8: 357.

Balan V, Nangia-Makker P, Schwartz AG, Jung YS, Tait L, Hogan V, et al. Racial disparity in breast cancer and functional germ line mutation in galectin-3 (rs4644): a pilot study. *Cancer Res* 2008;68: 10045-50.

Balasubramanian SP, Cox A, Cross SS, Higham SE, Brown NJ, Reed MW. Influence of VEGF-A gene variation and protein levels in breast cancer susceptibility and severity. *Int J Cancer* 2007;121: 1009-16.

Baldus SE, Zirbes TK, Weingarten M, Fromm S, Glossmann J, Hanisch FG, et al. Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. *Tumour Biol* 2000;21: 258-66.

Baniak N, Senger JL, Ahmed S, Kanthan SC, Kanthan R. Gastric biomarkers: a global review. *World J Surg Oncol* 2016;14: 212.

Bellini MF, Cadamuro AC, Succi M, Proenca MA, Silva AE. Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012: 891961.

Borges LM, Ayres FM. R337H mutation of the TP53 gene as a clinical marker in cancer patients: a systematic review of literature. *Genet Mol Res* 2015;14: 17034-43.

Bravard A, Vacher M, Moritz E, Vaslin L, Hall J, Epe B, et al. Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res* 2009;69: 3642-9.

Cacev T, Loncar B, Seiwerth S, Spaventi S, Kapitanovic S. Vascular endothelial growth factor polymorphisms -1154 G/A and -460 C/T are not associated with VEGF mRNA expression and susceptibility to sporadic colon cancer. *DNA Cell Biol* 2008;27: 569-74.

Cadamuro AC, Rossi AF, Maniezzo NM, Silva AE. *Helicobacter pylori* infection: host immune response, implications on gene expression and microRNAs. *World J Gastroenterol* 2014;20: 1424-37.

Canoz O, Belenli O, Patisroglu TE. General features of gastric carcinomas and comparison of HSP70 and NK cell immunoreactivity with prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002;8: 262-9.

Carneiro F, Oliveira C, Seruca R. Pathology and genetics of familial gastric cancer. *Int J Surg Pathol* 2010;18: 33S-36S.

Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* 2011;11: 2391-402.

Chang WJ, Du Y, Zhao X, Ma LY, Cao GW. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20: 4586-96.

Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014;6: 1670-90.

Chen MH, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. VEGF -460T --> C polymorphism and its association with VEGF expression and outcome to FOLFOX-4 treatment in patients with colorectal carcinoma. *Pharmacogenomics J* 2011;11: 227-36.

Cheng C, Lingyan W, Yi H, Cheng Z, Huadan Y, Xuting X, et al. Association between TLR2, MTR, MTRR, XPC, TP73, TP53 genetic polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014;38: 346-59.

Cheng D, Liang B, Li Y. Serum galectin-3 as a potential marker for gastric cancer. *Med Sci Monit* 2015;21: 755-60.

Cheng J, Fan XM. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression. *World J Gastroenterol* 2013;19: 7361-8.

Cheong TC, Shin JY, Chun KH. Silencing of galectin-3 changes the gene expression and augments the sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Sci* 2010;101: 94-102.

Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005;10: 86-103.

Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988;48: 3554-60.

Correa P, Shiao YH. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1994;54: 1941s-43s.

da Costa WL, Jr., Coimbra FJ, Ribeiro HS, Diniz AL, de Godoy AL, de Farias IC, et al. Total gastrectomy for gastric cancer: an analysis of postoperative and long-term outcomes through time: results of 413 consecutive cases in a single cancer center. *Ann Surg Oncol* 2015;22: 750-7.

Da MX, Wu XT, Wang J, Guo TK, Zhao ZG, Luo T, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer. *Arch Med Res* 2008;39: 92-9.

de Oliveira JG, Rossi AF, Nizato DM, Miyasaki K, Silva AE. Profiles of gene polymorphisms in cytokines and Toll-like receptors with higher risk for gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2013;58: 978-88.

Deng J, You Q, Gao Y, Yu Q, Zhao P, Zheng Y, et al. Prognostic value of perineural invasion in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9: e88907.

Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg* 2005;241: 27-39.

DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 2002;9: 12-6.

Dong J, Dai J, Zhang M, Hu Z, Shen H. Potentially functional COX-2-1195G>A polymorphism increases the risk of digestive system cancers: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25: 1042-50.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003;33: 357-65.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20: 4368-80.

Eng L, Liu G. VEGF pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a 2013 update. *Pharmacogenomics* 2013;14: 1659-67.

Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Nitti D, Basso D, de Bernard M, et al. Oxidative DNA damage in gastric cancer: CagA status and OGG1 gene polymorphism. *Int J Cancer* 2008;123: 51-5.

Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002;2: 8.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136: E359-86.

Ferrari F, Reis MA. Study of risk factors for gastric cancer by populational databases analysis. *World J Gastroenterol* 2013;19: 9383-91.

Ferrer-Ferrer M, Malespin-Bendana W, Ramirez V, Gonzalez MI, Carvajal A, Une C. Polymorphisms in genes coding for HSP-70 are associated with gastric cancer and duodenal ulcer in a population at high risk of gastric cancer in Costa Rica. *Arch Med Res* 2013;44: 467-74.

Francisco G, Goncalves FT, Luiz OC, Saito RF, Toledo RA, Sekiya T, et al. Polymorphisms in the p27kip-1 and prohibitin genes denote novel genes associated with melanoma risk in Brazil, a high ultraviolet index region. *Melanoma Res* 2013;23: 231-6.

Francisco G, Menezes PR, Eluf-Neto J, Chammas R. Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies. *Int J Cancer* 2011;129: 920-30.

Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, et al. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 1999;116: 1319-29.

Garcia-Gonzalez MA, Nicolas-Perez D, Lanás A, Bujanda L, Carrera P, Benito R, et al. Prognostic role of host cyclooxygenase and cytokine genotypes in a Caucasian cohort of patients with gastric adenocarcinoma. *PLoS One* 2012;7: e46179.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 2010;31: 143-50.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140: 883-99.

Guan X, Zhao H, Niu J, Tan D, Ajani JA, Wei Q. Polymorphisms of TGFB1 and VEGF genes and survival of patients with gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28: 94.

Guedes MT, de Jesus JP, de Souza Filho O, Fontenele RM, Sousa AI. Clinical and epidemiological profile of cases of deaths from stomach cancer in the National Cancer Institute, Brazil. *Ecancermedicalscience* 2014;8: 445.

Guggenheim DE, Shah MA. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Surg Oncol* 2013;107: 230-6.

Guimaraes RM, Muzi CD. Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). *Arq Gastroenterol* 2012;49: 184-8.

Guo P, Li Y, Zhu Z, Sun Z, Lu C, Wang Z, et al. Prognostic value of tumor size in gastric cancer: an analysis of 2,379 patients. *Tumour Biol* 2013;34: 1027-35.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144: 646-74.

Hanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, Hamada GS, et al. hOGG1 exon7 polymorphism and gastric cancer in case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Lett* 2001;170: 53-61.

HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Internation HapMap Consortium. Nature* 2005;437: 1299-320.

Hardbower DM, Peek RM, Jr., Wilson KT. At the Bench: *Helicobacter pylori*, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer. *J Leukoc Biol* 2014;96: 201-12.

He L, Deng T, Luo HS. Heat shock protein 70 gene polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *ScientificWorldJournal* 2014;2014: 540309.

Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009;230: 160-71.

Howell WM, Calder PC, Grimble RF. Gene polymorphisms, inflammatory diseases and cancer. *Proc Nutr Soc* 2002;61: 447-56.

Hu CY, Chang SK, Wu CS, Tsai WI, Hsu PN. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. *Clin Rheumatol* 2011;30: 1227-33.

Huang ZH, Hua D, Du X. Polymorphisms in p53, GSTP1 and XRCC1 predict relapse and survival of gastric cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64: 1001-7.

Huang ZH, Hua D, Li LH, Zhu JD. Prognostic role of p53 codon 72 polymorphism in gastric cancer patients treated with fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134: 1129-34.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. 2016.

Iwata C, Kano MR, Komuro A, Oka M, Kiyono K, Johansson E, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis. *Cancer Res* 2007;67: 10181-9.

Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res* 2004;14: 491-9.

Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001;47: 617-23.

Joo YE, Oh WT, Rew JS, Park CS, Choi SK, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. *Digestion* 2002;66: 222-9.

Jupe ER, Badgett AA, Neas BR, Craft MA, Mitchell DS, Resta R, et al. Single nucleotide polymorphism in prohibitin 3' untranslated region and breast-cancer susceptibility. *Lancet* 2001;357: 1588-9.

Jupe ER, Liu XT, Kiehlbauch JL, McClung JK, Dell'Orco RT. Prohibitin in breast cancer cell lines: loss of antiproliferative activity is linked to 3' untranslated region mutations. *Cell Growth Differ* 1996;7: 871-8.

Kang X, Zhang L, Sun J, Ni Z, Ma Y, Chen X, et al. Prohibitin: a potential biomarker for tissue-based detection of gastric cancer. *J Gastroenterol* 2008;43: 618-25.

Karahalil B, Bohr VA, Wilson DM, 3rd. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol* 2012;31: 981-1005.

Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014.

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114: 1265-73; quiz 74.

Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, Suzuki S, Matsukura S, Kokubu F, et al. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117: 795-801.

Ke Q, Liang J, Wang LN, Hu ZB, Jin GF, Zhou Y, et al. Potentially functional polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene and risk of gastric cancer. *Mol Carcinog* 2008;47: 647-51.

Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003;56: 1-9.

Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Cho YY, Bae HI, Yan G, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with gastric cancer. *Ann Oncol* 2007;18: 1030-6.

Kim SJ, Shin JY, Cheong TC, Choi IJ, Lee YS, Park SH, et al. Galectin-3 germline variant at position 191 enhances nuclear accumulation and activation of beta-catenin in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2011;28: 743-50.

Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7: 259-70.

Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol* 2012;13: e249-58.

Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46: 293-8.

Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2003;106: 468-71.

Kuang D, Chen W, Song YZ, Yu YY, Zhang DY, Wu L, et al. Association between the HSPA1B +/-1267A/G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 14 case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15: 6855-61.

Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64: 31-49.

Leal MF, Calcagno DQ, Chung J, de Freitas VM, Demachki S, Assumpcao PP, et al. Deregulated expression of annexin-A2 and galectin-3 is associated with metastasis in gastric cancer patients. *Clin Exp Med* 2014.

Leal MF, Cirilo PD, Mazzotti TK, Calcagno DQ, Wisnieski F, Demachki S, et al. Prohibitin expression deregulation in gastric cancer is associated with the 3' untranslated region 1630 C>T polymorphism and copy number variation. *PLoS One* 2014;9: e98583.

Lee HW, Lee EH, Kim SH, Roh MS, Jung SB, Choi YC. Heat shock protein 70 (HSP70) expression is associated with poor prognosis in intestinal type gastric cancer. *Virchows Arch* 2013;463: 489-95.

Leung AM, Redlak MJ, Miller TA. Role of heat shock proteins in oxygen radical-induced gastric apoptosis. *J Surg Res* 2015;193: 135-44.

Lewis CM, Knight J. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2012;2012: 297-306.

Li H, Ren C, Fan Z, Jin G, Du J, Liu L, et al. A genetic variant in 3'-untranslated region of cyclooxygenases-2 gene is associated with risk of gastric cancer in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2012;31: 1252-7.

Li M, Liu W, Zhu YF, Chen YL, Zhang BZ, Wang R. Correlation of COX-2 and K-ras expression to clinical outcome in gastric cancer. *Acta Oncol* 2006;45: 1115-9.

Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, Castellano P, Mura AL, Pinto M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2008;15: 69-79.

Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;136: 385-400.

Liu H, Ma Q, Xu Q, Lei J, Li X, Wang Z, et al. Therapeutic potential of perineural invasion, hypoxia and desmoplasia in pancreatic cancer. *Curr Pharm Des* 2012;18: 2395-403.

Liu H, Wang S, Huang C. VEGFA+936C/T and -634G/C polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12: 1979-83.

Liu KJ, Qi HZ, Yao HL, Lei SL, Lei ZD, Li TG, et al. An updated meta-analysis of the p53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk. *Mol Biol Rep* 2012;39: 8265-75.

Liu L, Ma XL, Xiao ZL, Li M, Cheng SH, Wei YQ. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in resected gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13: 3089-97.

Lochhead P, El-Omar EM. Gastric cancer. *Br Med Bull* 2008;85: 87-100.

Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006;4: 221-33.

Lunetta KL. Genetic association studies. *Circulation* 2008;118: 96-101.

Lurje G, Nagashima F, Zhang W, Yang D, Chang HM, Gordon MA, et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin Cancer Res* 2008;14: 7884-95.

Mabley JG, Pacher P, Deb A, Wallace R, Elder RH, Szabo C. Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. *FASEB J* 2005;19: 290-2.

Macedo GS, Lisboa da Motta L, Giacomazzi J, Netto CB, Manfredini V, Vanzin CS, et al. Increased oxidative damage in carriers of the germline TP53 p.R337H mutation. *PLoS One* 2012;7: e47010.

Machado CM, Andrade LN, Teixeira VR, Costa FF, Melo CM, dos Santos SN, et al. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGFbeta1-induced macrophages. *Cancer Med* 2014;3: 201-14.

Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77: 858-63.

Makhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum Immunol* 1998;59: 571-9.

Manjeshwar S, Branam DE, Lerner MR, Brackett DJ, Jupe ER. Tumor suppression by the prohibitin gene 3'untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Res* 2003;63: 5251-6.

Marrelli A, Cipriani P, Liakouli V, Carubbi F, Perricone C, Perricone R, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation? *Autoimmun Rev* 2011;10: 595-8.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009;27: 451-83.

Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987;7: 961-3.

McLean MH, El-Omar EM. Genetic aspects of inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9: 370-4.

Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991;173: 209-19.

Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet* 2009;126: 615-28.

Milner CM, Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1992;36: 357-62.

Miyazaki J, Hokari R, Kato S, Tsuzuki Y, Kawaguchi A, Nagao S, et al. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. *Oncol Rep* 2002;9: 1307-12.

Moore AE, Young LE, Dixon DA. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene* 2012;31: 1592-8.

Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sawaoka H, Kimura Y, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 451-5.

Nangia-Makker P, Raz T, Tait L, Hogan V, Fridman R, Raz A. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. *Cancer Res* 2007;67: 11760-8.

Nangia-Makker P, Wang Y, Raz T, Tait L, Balan V, Hogan V, et al. Cleavage of galectin-3 by matrix metalloproteases induces angiogenesis in breast cancer. *Int J Cancer* 2010;127: 2530-41.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18: 1135-49.

Neves Filho EH, Cordeiro DE, Vieira AP, Rabenhorst SH. TP53 codon 72 and intron 3 polymorphisms and mutational status in gastric cancer: an association with tumor onset and prognosis. *Pathobiology* 2012;79: 323-8.

Oh SY, Kwon HC, Kim SH, Lee S, Lee JH, Hwang JA, et al. The relationship of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and clinical outcome in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX: VEGF polymorphism in gastric cancer. *BMC Cancer* 2013;13: 43.

Okada K, Shimura T, Suehiro T, Mochiki E, Kuwano H. Reduced galectin-3 expression is an indicator of unfavorable prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res* 2006;26: 1369-76.

Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol* 2015;16: e60-70.

Palli D, Polidoro S, D'Errico M, Saieva C, Guarrera S, Calcagnile AS, et al. Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric cancer. *Mutagenesis* 2010;25: 569-75.

Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* 2008;261: 21-5.

Partida-Rodriguez O, Torres J, Flores-Luna L, Camorlinga M, Nieves-Ramirez M, Lazcano E, et al. Polymorphisms in TNF and HSP-70 show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer. *Int J Cancer* 2010;126: 1861-8.

Pasini FS, Zilberstein B, Snitcovsky I, Roela RA, Mangone FR, Ribeiro U, Jr., et al. A gene expression profile related to immune dampening in the tumor microenvironment is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *J Gastroenterol* 2014;49: 1453-66.

Perini JA, Cardoso JV, Berardo PT, Vianna-Jorge R, Nasciutti LE, Bellodi-Privato M, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C>A, -460 T>C, -1154G>A, +405G>C and +936C>T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. *BMC Womens Health* 2014;14: 117.

Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004;108: 196-9.

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonca BB, Latronico AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48: 647-50.

Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* 1993;38: 491-5.

Qiao Q, Hu W. The association between TP53 Arg72Pro polymorphism and lung cancer susceptibility: evidence from 30,038 subjects. *Lung* 2013;191: 369-77.

Quiding-Jarbrink M, Raghavan S, Sundquist M. Enhanced M1 macrophage polarization in human helicobacter pylori-associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS One* 2010;5: e15018.

Radovich M, Hancock BA, Kassem N, Mi D, Skaar TC, Schneider BP. Resequencing of the vascular endothelial growth factor promoter reveals haplotype structure and functional diversity. *Angiogenesis* 2010;13: 211-8.

Ramsay RG, Friend A, Vizantios Y, Freeman R, Sicurella C, Hammett F, et al. Cyclooxygenase-2, a colorectal cancer nonsteroidal anti-inflammatory drug target, is regulated by c-MYB. *Cancer Res* 2000;60: 1805-9.

Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000;37: 443-8.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98: 9330-5.

Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, Green NM. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *Embo J* 1991;10: 1053-9.

Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, et al. Helicobacter pylori up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro. *J Biol Chem* 1998;273: 28560-3.

Sa-Nguanraksa D, Chuangsuwanich T, Pongpruttipan T, Kummalue T, Rojananin S, Ratanawichhitrasin A, et al. Vascular endothelial growth factor 634G/C polymorphism is associated with increased breast cancer risk and aggressiveness. *Mol Med Rep* 2013;8: 1242-50.

Saito H, Osaki T, Murakami D, Sakamoto T, Kanaji S, Oro S, et al. Macroscopic tumor size as a simple prognostic indicator in patients with gastric cancer. *Am J Surg* 2006;192: 296-300.

Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, et al. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatol Res* 2010;40: 1219-26.

Sanchez-Quiles V, Segura V, Bigaud E, He B, O'Malley BW, Santamaria E, et al. Prohibitin-1 deficiency promotes inflammation and increases sensitivity to liver injury. *J Proteomics* 2012;75: 5783-92.

Scartozzi M, Loretelli C, Galizia E, Mandolesi A, Pistelli M, Bittoni A, et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-R genotyping in guiding the metastatic process in pT4a resected gastric cancer patients. *PLoS One* 2012;7: e38192.

Schneider BG, Camargo MC, Ryckman KK, Sicinschi LA, Piazzuelo MB, Zabaleta J, et al. Cytokine polymorphisms and gastric cancer risk: an evolving view. *Cancer Biol Ther* 2008;7: 157-62.

Schroeder S, Bischoff J, Lehmann LE, Hering R, von Spiegel T, Putensen C, et al. Endotoxin inhibits heat shock protein 70 (HSP70) expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 1999;25: 52-7.

Shaik-Dasthagirisahab YB, Varvara G, Murmura G, Saggini A, Potalivo G, Caraffa A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013;26: 327-35.

Shibata T, Arisawa T, Tahara T, Hirata I, Nakano H. A polymorphism in the 3'-utr of cyclooxygenase-2 and the risk of gastric cancer. *Mol Med Rep* 2008;1: 561-4.

Shibata T, Arisawa T, Tahara T, Yoshioka D, Maruyama N, Fujita H, et al. Protective role of genetic polymorphism of heat shock protein 70-2 for gastric cancer risk. *Dig Dis Sci* 2009;54: 70-4.

Song L, Tang JW, Owusu L, Sun MZ, Wu J, Zhang J. Galectin-3 in cancer. *Clin Chim Acta* 2014;431C: 185-91.

Staib F, Robles AI, Varticovski L, Wang XW, Zeeberg BR, Sirotnin M, et al. The p53 tumor suppressor network is a key responder to microenvironmental components of chronic inflammatory stress. *Cancer Res* 2005;65: 10255-64.

Steffensen KD, Waldstrom M, Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;117: 109-16.

Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 2003;63: 812-6.

Subhash VV, Ho B. Galectin 3 acts as an enhancer of survival responses in *H. pylori*-infected gastric cancer cells. *Cell Biol Toxicol* 2016;32: 23-35.

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347: 1175-86.

Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011: 978312.

Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004;327-49.

Tang W, Zhou X, Nie S, Yang Z, Zhu H, Wu X, et al. Association of p53 Arg72Pro polymorphism with gastric cancer: a meta-analysis. *Biomarkers* 2012;17: 597-603.

TCGA. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513: 202-9.

Theiss AL, Sitaraman SV. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813: 1137-43.

Thiel A, Mrena J, Ristimäki A. Cyclooxygenase-2 and gastric cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30: 387-95.

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999;19: 1092-100.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266: 11947-54.

Touati E, Michel V, Thiberge JM, Ave P, Huerre M, Bourgade F, et al. Deficiency in OGG1 protects against inflammation and mutagenic effects associated with *H. pylori* infection in mouse. *Helicobacter* 2006;11: 494-505.

Uedo N, Yao K, Ishihara R. Screening and treating intermediate lesions to prevent gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2013;42: 317-35.

Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20: 651-74.

Vecchi M, Nuciforo P, Romagnoli S, Confalonieri S, Pellegrini C, Serio G, et al. Gene expression analysis of early and advanced gastric cancers. *Oncogene* 2007;26: 4284-94.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93: 1493-5.

Wadhwa R, Song S, Lee JS, Yao Y, Wei Q, Ajani JA. Gastric cancer-molecular and clinical dimensions. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10: 643-55.

Wang M, Bai J, Tan Y, Wang S, Tian Y, Gong W, et al. Genetic variant in PSCA predicts survival of diffuse-type gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 2011;129: 1207-13.

Wang S, Chen L, Zhao Q, Rong H, Wang M, Gong W, et al. Effect of TP53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms on survival of gastric cancer among patients who receiving 5-fluorouracil-based postoperative adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71: 1073-82.

Wang Y, Jiang H, Liu T, Tang W, Ma Z. Cyclooxygenase-2 -1195G>A (rs689466) polymorphism and cancer susceptibility: an updated meta-analysis involving 50,672 subjects. *Int J Clin Exp Med* 2015;8: 12448-62.

Wang Z, Chen JQ, Liu JL. COX-2 Inhibitors and Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2014;2014: 132320.

Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12: 1232-5.

Weston K. Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8: 76-81.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 3195-9.

Wu MS, Chen CJ, Lin JT. Host-environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development of new approaches to prevent and treat gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14: 1878-82.

Wu X, Zeng Z, Chen B, Yu J, Xue L, Hao Y, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *Int J Cancer* 2010;127: 86-92.

Wu YR, Wang CK, Chen CM, Hsu Y, Lin SJ, Lin YY, et al. Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. *Hum Genet* 2004;114: 236-41.

Wunsch-Filho V, Eluf-Neto J, Lotufo PA, Silva WA, Jr., Zago MA. Epidemiological studies in the information and genomics era: experience of the Clinical Genome of Cancer Project in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2006;39: 545-53.

Xiang B, Mi YY, Li TF, Liu PF. Updated meta-analysis of the TP53 Arg72Pro polymorphism and gastric cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13: 1787-91.

Xiao F, Furuta T, Takashima M, Shirai N, Hanai H. Involvement of cyclooxygenase-2 in hyperplastic gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15: 875-86.

Xu Z, Shi R, Zhang R, Zhang D, Wang L. Association between tumor necrosis factor beta 252 A/G polymorphism and risk of gastric cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 2013;34: 4001-5.

Yang Z, Nie S, Zhu H, Wu X, Jia S, Luo Y, et al. Association of p53 Arg72Pro polymorphism with bladder cancer: a meta-analysis. *Gene* 2013;512: 408-13.

Yoshida T, Ono H, Kuchiba A, Saeki N, Sakamoto H. Genome-wide germline analyses on cancer susceptibility and GeMDBJ database: Gastric cancer as an example. *Cancer Sci* 2010;101: 1582-9.

Yuzhalin A. The role of interleukin DNA polymorphisms in gastric cancer. *Hum Immunol* 2011;72: 1128-36.

Zablotna M, Sobjanek M, Nedoszytko B, Lange M, Kozicka D, Glen J, et al. Association of psoriasis with the VEGF gene polymorphism in the northern Polish population. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013;27: 319-23.

Zhai R, Gong MN, Zhou W, Thompson TB, Kraft P, Su L, et al. Genotypes and haplotypes of the VEGF gene are associated with higher mortality and lower VEGF plasma levels in patients with ARDS. *Thorax* 2007;62: 718-22.

Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* 2005;129: 565-76.

Zhao L, Zhao X, Wu X, Tang W. Association of p53 Arg72Pro polymorphism with esophageal cancer: a meta-analysis based on 14 case-control studies. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013;17: 721-6.

Zhao ZQ, Yang S, Lu HS. Expression of midkine and vascular endothelial growth factor in gastric cancer and the association of high levels with poor prognosis and survival. *Mol Med Rep* 2012;5: 415-9.

Zhou LP, Luan H, Dong XH, Jin GJ, Man DL, Shang H. Vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphism and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Exp Ther Med* 2011;2: 931-36.

Zhou TB, Yin SS, Huang JJ, Ou C. Relationship between the prohibitin 3' untranslated region C > T gene polymorphism and cancer susceptibility--results of a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13: 3319-23.

Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, et al. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: a meta-analysis of the literature. *Int J Cancer* 2007;121: 1481-6.

Zhu F, Zhao H, Tian X, Meng X. Association between tumor necrosis factor-alpha rs1800629 polymorphism and risk of gastric cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 2014.

Zilberstein B, Malheiros C, Lourenco LG, Kassab P, Jacob CE, Weston AC, et al. Brazilian consensus in gastric cancer: guidelines for gastric cancer in Brazil. *Arq Bras Cir Dig* 2013;26: 2-6.

APÊNDICE

Apolipoprotein A1 gene polymorphisms as risk factors for hypertension and obesity

Elizabeth Suchi Chen · Diego Robles Mazzotti · Tatiane Katsue Furuya ·
Maysa Seabra Cendoroglo · Luiz Roberto Ramos · Lara Quirino Araujo ·
Rommel Rodriguez Burbano · Marília de Arruda Cardoso Smith

Received: 26 November 2008 / Accepted: 5 April 2009 / Published online: 1 May 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Several polymorphisms in apolipoprotein A1 (*APOA1*) gene have been associated with metabolic diseases. Increased transcription efficiency was observed in –75A allele carriers compared to –75G allele homozygotes. +83C allele was associated with higher body mass index and waist-to-hip ratio in type II diabetes subjects. –75G/A and +83C/T polymorphisms were analyzed by RFLP-PCR in 334 individuals from a Brazilian elderly cohort. *APOA1* polymorphisms were associated with age-related morbidities, as well as with triglycerides, total cholesterol, HDL, VLDL, LDL, creatinine, urea, albumin, glycated hemoglobin and fasting glucose serum levels. Allele frequencies were 0.102 and 0.21, respectively, for –75A and +83T. –75G allele showed significant association with hypertension ($P = 0.001$). An association between +83C allele and obesity was observed ($P = 0.040$) and this allele also showed an association with hypertension in the presence of cardiovascular disease ($P = 0.047$). Moreover, +83T allele was associated with lower glycated hemoglobin values ($P = 0.026$). To our knowledge, there is no data associating this polymorphism

with glycated hemoglobin. Furthermore, individuals carrying AT haplotype have lower risk for developing hypertension ($P = 0.0002$), while GT haplotype carriers present decreased risk to develop obesity comparing to GC haplotype ($P = 0.025$). *APOA1* polymorphisms analysis may be a useful tool to identify risk factors for subjects and families and clarify the physiopathological role of these polymorphisms in age-related diseases, such as hypertension and obesity.

Keywords *APOA1* polymorphisms · Hypertension · Obesity · Glycated hemoglobin

Introduction

Diseases involving cardiovascular system are the most important cause of mortality in most of the world's developed and developing countries. In Brazil, it involves 32.5% of deaths, particularly after the age of 45, followed by neoplasia (16%) [1]. Increased plasma triglycerides (TG) levels and reduction of HDL/LDL ratio are independent risk factors for these diseases [2] and important determinants of cardiovascular diseases and atherosclerosis susceptibility [3]. Apolipoproteins are closely involved in lipid metabolism. *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster, located in 11q23, has been associated with familial combined hyperlipidemia [4, 5] and with lipid plasma levels [6–8].

APOA1, a 28-kDa protein, is the major component of HDL and an antiatherogenic factor by promoting reverse cholesterol transport. The close relationship between APOA1 and HDL levels is well described [9]. As a result, APOA1 plays a critical role in the lipid metabolism and is a protective factor against coronary heart disease [10]. Thus, APOA1 is a strong marker for cardiovascular disease [11].

E. S. Chen · D. R. Mazzotti · T. K. Furuya ·
R. R. Burbano · M. de Arruda Cardoso Smith (✉)
Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética,
Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo,
Rua Botucatu, 740, Edifício Leão da Cunha–1 andar,
São Paulo, SP CEP 04023-900, Brazil
e-mail: betty.morf@epm.br

D. R. Mazzotti
e-mail: dieroblemazzotti@yahoo.com.br

M. S. Cendoroglo · L. R. Ramos · L. Q. Araujo
Geriatrics Division, Department of Medicine, UNIFESP,
São Paulo, Brazil

Association of *PPARα* gene polymorphisms and lipid serum levels in a Brazilian elderly population

Elizabeth Suchi Chen^a, Diego Robles Mazzotti^a, Tatiane Katsue Furuya^a,
Maysa Seabra Cendoroglo^b, Luiz Roberto Ramos^b, Lara Quirino Araujo^a,
Rommel Rodriguez Burbano^a, Marília de Arruda Cardoso Smith^{a,*}

^a Genetics Division, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^b Geriatrics Division, Department of Medicine, UNIFESP, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2009

and in revised form 5 October 2009

Available online 12 October 2009

Keywords:

PPARα polymorphisms

Intron 7

L162V

Triglycerides

HDL and VLDL serum levels

ABSTRACT

Peroxisome proliferator-activated receptor α (*PPARα*) is a nuclear transcription factor strictly involved in lipid and lipoprotein metabolisms. Thus, *PPARα* gene polymorphisms have been investigated as cardiovascular risk factors. We aimed to investigate associations of L162V and intron 7 G>C polymorphisms with common morbidities affecting a Brazilian elderly cohort as well as with lipid and protein serum levels. Genotyping was performed by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and allele frequencies were determined. In addition, we performed the linkage disequilibrium analysis. Descriptive statistics, logistic regression analysis, and Student's *t*-test were used. Rare alleles for L162V and intron 7 G>C polymorphisms showed frequencies of 0.047 and 0.199, respectively. Our data showed that these polymorphisms were in linkage disequilibrium ($p = 0.0002$). Intron 7 G>C polymorphism presented a tendency of association with neoplasia ($p = 0.053$), and C allele was associated with higher HDL ($p = 0.010$), lower triglycerides ($p = 0.001$), and VLDL levels ($p = 0.003$) compared to G allele. These data might suggest a protective role of intron 7 G>C polymorphism in the development of cardiovascular diseases and will help to clarify the importance of *PPARα* polymorphisms as key modulators of lipid metabolism in Brazilian population.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the major cause of death in adults in several countries (Mansur et al., 2001; Uemura and Pisa, 1985). Alterations in lipid and lipoprotein metabolisms have been investigated as important CVD risk factors. High triglycerides (TG) and low HDL levels are strong predictable factors of cardiac events (Cullen, 2000). Either environmental or genetic influence can be determinant on lipoprotein levels, which may affect the risk of developing CVD. Thus, key metabolism regulators such as the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family are candi-

date genes to investigate genetic predisposition of these complex diseases.

PPAR family members are nuclear receptors involved in lipid and carbohydrate metabolisms, adipogenesis, and insulin sensitivity (Yong et al., 2008). There are three isoforms of PPAR receptors expressed in humans—PPAR α , PPAR γ , and PPAR β/δ (Tai et al., 2002). PPAR α is highly expressed in tissues with high fatty acid catabolism and integrates several metabolic pathways, including fatty acid β -oxidation, lipoprotein synthesis, and amino acid catabolism (Yong et al., 2008). Once activated, PPAR α binds to retinoid X receptor α to form a heterodimer, which recognizes specific DNA sequence elements, located in the promoter region of target genes (Prieur et al., 2003).

PPAR α is located on 22q13.3, and it consists of eight exons. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were described in this gene and associated with dyslipidemia, insulin resistance, diabetes, and CVD (Yong et al., 2008). L162V polymorphism (rs1800206) represents a C to G substitution leading to a leucine to valine amino acid exchange in codon 162 (Flavell et al., 2000; Sapone et al., 2000). This polymorphism was associated with variation in total cholesterol, LDL, HDL, TG, APOB, and APOA1 plasma concentrations, but these associations were controversial (Yong et al., 2008). The intron 7 G>C polymorphism

Abbreviations: PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; PCR-RFLP, polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism; CVD, cardiovascular disease; TG, triglycerides; SNP, single nucleotide polymorphism; EPIDOSO, Elderly Longitudinal Study; ECG, electrocardiogram; CT, computerized tomography; COX-2, cyclooxygenase 2; TRL, TG-rich lipoproteins; LPL, lipoprotein lipase.

* Corresponding author. Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 1° andar, CEP 04023-900 – São Paulo/SP – Brasil. Fax: +5511 5576 4260/5576 4264.

E-mail address: betty.morf@epm.br (M.A.C. Smith).

APOA1/A5 Variants and Haplotypes as a Risk Factor for Obesity and Better Lipid Profiles in a Brazilian Elderly Cohort

Elizabeth Suchi Chen · Tatiane Katsue Furuya · Diego Robles Mazzotti ·
Vanessa Kiyomi Ota · Maysa Seabra Cendoroglo · Luiz Roberto Ramos ·
Lara Quirino Araujo · Rommel Rodriguez Burbano · Marília de Arruda Cardoso Smith

Received: 16 November 2009 / Accepted: 22 April 2010 / Published online: 18 May 2010
© AOCS 2010

Abstract Genetic variations in the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster have been studied and proposed to be the leading key for susceptibility to cardiovascular diseases and age-associated disorders. We aimed to investigate the associations of rs12721026 (*APOA1*) and rs1729408 (*APOA5*) polymorphisms and their haplotypes with some age-related diseases, as well as with lipids and proteins serum levels in a cohort from a Brazilian Elderly Longitudinal Study (EPIDOSO). Genotyping was performed by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analyses were carried out using logistic regression analysis, Student's *t*-test, and linkage disequilibrium (LD) analysis. Polymorphic allele frequencies were 0.095 and 0.449 for rs12721026 and rs1729408, respectively. The C-allele of rs1729408 was associated with higher high-density lipoprotein (HDL) ($P = 0.022$) and glycated hemoglobin levels ($P = 0.020$). We also showed that rs12721026 and rs1729408 were in LD. The GC haplotype, which is composed of the G-allele of rs12721026 and the C-allele of rs1729408, was significantly associated with obesity ($P = 0.028$), with higher glycated hemoglobin ($P = 0.006$), and fasting glucose ($P = 0.0003$) compared to

the TT haplotype, which includes the wild-type alleles of both polymorphisms. Moreover, we found an association between the TC haplotype and higher HDL levels ($P = 0.0039$). This is the first time that haplotypes involving these polymorphisms were evaluated. Our results showed that these polymorphisms were involved in the development of obesity and in alterations of lipids and proteins serum levels in a Brazilian population. The present findings might also clarify the role of these polymorphisms and their haplotypes in lipids and proteins metabolism.

Keywords Obesity · Glycated hemoglobin · Polymorphisms · *APOA1* · *APOA5* · HDL · Haplotype

Abbreviations

BMI	Body mass index
CVD	Cardiovascular disease
HbA1c	Glycated hemoglobin
LD	Linkage disequilibrium
MMSE	Mini-Mental State Examination
SD	Standard deviation
SNP	Single nucleotide polymorphism
TG	Triglyceride
OR	Odds ratio
CI	Confidence interval

Introduction

Increased low-density lipoprotein (LDL) and triglyceride (TG) [1] and decreased high-density lipoprotein (HDL) plasma levels have been shown to be independent risk factors for cardiovascular diseases (CVDs) [2] and

E. S. Chen · T. K. Furuya · D. R. Mazzotti ·
V. K. Ota · L. Q. Araujo · R. R. Burbano ·
M. de Arruda Cardoso Smith (✉)
Genetics Division, Department of Morphology and Genetics,
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu,
740, Edifício Leitão da Cunha, 1° Andar, São Paulo,
SP 04023-900, Brazil
e-mail: betty.morf@epm.br

M. S. Cendoroglo · L. R. Ramos
Department of Medicine, Universidade Federal de São Paulo
(UNIFESP), São Paulo, Brazil

APOA4 Polymorphism as a Risk Factor for Unfavorable Lipid Serum Profile and Depression: A Cross-Sectional Study

Vanessa Kiyomi Ota, BSc,* Elizabeth Suchi Chen, PhD,* Tatiana Flank Ejchel, PhD,*
Tatiane Katsue Furuya, BSc,* Diego Robles Mazzotti, BSc,* Maysa Seabra Cendoroglo, PhD,†
Luiz Roberto Ramos, PhD,† Lara Quirino Araujo, MD,† Rommel Rodriguez Burbano, PhD,*
and Marília de Arruda Cardoso Smith, PhD*

Introduction: *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster is closely involved in lipid metabolism, and its polymorphisms have been associated with coronary heart disease and lipid plasma levels. Here, we aimed to investigate associations of *APOC3* (3238C>G, -482C>T, 1100C>T) and *APOA4* (Gln360His, Thr347Ser) polymorphisms in 382 individuals from a cohort of a Longitudinal Brazilian Elderly Study with major age-related morbidities and with lipid and protein serum levels.

Materials and Methods: The whole sample was genotyped by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism. Descriptive statistics, logistic regression analysis, Student *t* test, deviation from Hardy-Weinberg, Bonferroni correction for multiple testing, and haplotype analyses were performed.

Results: Although *APOC3* 1100T allele carriers presented lower triglyceride and very low density lipoprotein levels than non-T carriers, these associations disappeared after Bonferroni correction ($P > 0.05$). Moreover, *APOA4* 360His allele was associated with depression ($P = 0.03$), increased triglyceride ($P = 0.035$) and very low density lipoprotein ($P = 0.035$) levels, and reduced HDL levels ($P = 0.0005$). Haplotype analyses found an association between His/C/C haplotype (Gln360His/-482C>T/1100C>T) with depression, but this result was due to Gln360His polymorphism.

Conclusions: Our data suggest that 360His allele might be a risk factor for depression and unfavorable lipid profile and depression for elderly people in the Brazilian population.

Key Words: *APOC-III*, *APOA-IV*, elderly population, HDL, triglycerides (*J Invest Med* 2011;59: 00–00)

Ageing is generally associated with increased predisposition to illness and death due to the altered homeostasis and the reduced responsiveness to environmental factors.¹ Diseases involving the cardiovascular system are the most important cause of mortality in most developed and in developing countries

and cause around 32% of deaths in Brazil, particularly after the age of 45 years.² Increased plasma triglyceride (TG) levels and reduction of high-density lipoprotein/low-density lipoprotein (HDL/LDL) ratio are independent risk factors for atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD).³ *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster, located on 11q23, is closely involved in lipid metabolism and has been associated with coronary heart disease,⁴ obesity,⁵ and with lipid plasma levels.⁶

APOC3 is a surface component of TG-rich lipoproteins and is a noncompetitive inhibitor of lipoprotein lipase.⁷ *APOC3* has been associated with CVD⁸ and with higher TG levels.⁹ Moreover, most of the therapies used in lowering TG, such as niacin, fish oil, and fibrates, are associated with a decrease in *APOC3* expression.¹⁰ Common polymorphisms were identified in *APOC3* promoter (-482C>T - rs2854117), exon 3 (1100C>T - rs4520), and in 3'-untranslated region (3238C>G - rs5128). These polymorphisms have been associated with hypertriglyceridemia¹¹ and susceptibility to CVD in European,¹² Chinese,¹³ and Asian Indian populations.¹¹ *APOC3* 1100C>T polymorphism has not yet been studied in the Brazilian population.

APOA4, another apolipoprotein within this gene cluster, acts as a satiety signal¹⁴ and has been proposed to be a protective factor for atherosclerosis.¹⁵ Two polymorphisms in *APOA4* (Gln360His - rs5110 and Thr347Ser - rs675) have been characterized. It was shown that Gln360His polymorphism was associated with obesity and depression and that 360His allele carriers presented 2-fold increased risk for both morbidities.¹⁶

To establish whether polymorphisms of *APOC3* and *APOA4* might act as risk factors for some age-related diseases in a Brazilian elderly cohort, we assessed the association of *APOC3* 3238C>G, -482C>T, and 1100C>T polymorphisms and *APOA4* Gln360His and Thr347Ser polymorphisms and their haplotypes with morbidities (CVD, type 2 diabetes, hypertension, obesity, depression, dementia, and neoplasia), TG, total cholesterol, HDL, very low density lipoprotein (VLDL), LDL, creatinine, urea, albumin, glycated hemoglobin (Hb_{A1c}), and fasting glucose serum levels.

MATERIALS AND METHODS

Population

The Elderly Longitudinal Study (EPIDOSO)¹⁷ began in 1991 and originally involved 1667 people older than 66 years living in a community of São Paulo, Brazil. Subjects were clinically evaluated every other year and a subsample of 382 (261 females and 121 males) in wave 4 (2000–2001) was invited to participate in our study. The mean age of this population was 79.82 (5.31) years (age range, 66–97 years). This population was composed of individuals of European (89.2%), Japanese (3.3%), Middle Eastern (1.8%), and mixed and/or other (5.7%) origins.

From the *Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, and †Disciplina de Geriatria, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Received March 11, 2011, and in revised form May 9, 2011.

Accepted for publication May 11, 2011.

Reprints: Vanessa Kiyomi Ota, Disciplina de Genética, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740 – Edifício Leão da Cunha – 1º andar, CEP 04023-900 – São Paulo/SP – Brazil. E-mail: anessakaota@gmail.com and Marília de Arruda Cardoso Smith, PhD, Disciplina de Genética, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 740 – Edifício Leão da Cunha – 1º andar, CEP 04023-900 – São Paulo/SP – Brazil. E-mail: macsmith.morf@epm.br.

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Brazil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Brazil).

Copyright © 2011 by The American Federation for Medical Research

ISSN: 1081-5589

DOI: 10.2311/JIM.0b013e31822467cd

PPAR α polymorphisms as risk factors for dyslipidemia in a Brazilian population

Diego Robles Mazzotti^{a,1}, Cristiane Carvalho Singulane^b, Vanessa Kiyomi Ota^{a,1}, Thiago Potrich Rodrigues^b, Tatiane Katsue Furuya^{a,1}, Fernando José de Souza^b, Bruna Grassiela Cordeiro^b, Camila Magalhães^b, Elizabeth Suchi Chen^{a,1}, Anielli Jacomini^b, Marília de Arruda Cardoso Smith^{a,*}, Bianca Borsatto-Galera^c

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740, Edifício Leitão da Cunha, 1^a andar, CEP 04023-900, São Paulo/SP, Brazil

^b Unidade de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

^c Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2010

Received in revised form 10 November 2010

Accepted 10 November 2010

Available online 15 December 2010

Keywords:

PPAR α

Dyslipidemia

L162V

Intron 7

Genetic association

Polymorphism

Haplotype

ABSTRACT

Background and aims: Peroxisome proliferator-activated receptor α is a nuclear receptor involved in the regulation of several biochemical pathways. Polymorphisms within its gene have been associated with several metabolic traits. We aimed to investigate the association of L162V and Intron 7G>C polymorphisms with serum level markers and common morbidities affecting an older adult/elderly cohort from Cuiabá City, Mato Grosso State, Brazil, as well as to compare the results with a previously studied population from São Paulo City, Brazil. **Methods and results:** The studied population consisted of 570 subjects from Cuiabá City, Brazil, who were subjected to clinical interviews and blood collection for laboratory examinations and DNA extraction. Dyslipidemia was defined when participants were taking oral hypolipemians or those with total cholesterol above 200 mg/dL, HDL-c below 40 mg/dL, LDL-c above 130 mg/dL and TG above 150 mg/dL. Restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction (RFLP-PCR) was used for polymorphism genotyping. Individual polymorphism and haplotype data were available for analyses. In the studied sample, allele frequencies were 0.052 and 0.292 for 162V and Intron 7C, respectively. In brief, 162V allele was associated with dyslipidemia ($p = 0.025$), and after correction for alcohol consumption and waist-to-hip ratio, a tendency of association could still be observed ($p = 0.050$). In addition, Intron 7C allele was associated with dyslipidemia even after correction for the same variables ($p = 0.029$). When compared to our previous study from São Paulo, we found some divergences regarding these results, which may be explained by differences between the two populations. Haplotype association analyses revealed an association between L/C haplotype and dyslipidemia ($p = 0.021$) and between V/C haplotype and lower LDL-c levels when compared to L/G haplotype ($p = 0.044$). **Conclusion:** These results may help to clarify the role of PPAR α gene in lipid and lipoprotein metabolism and the evaluation of its polymorphisms and haplotypes as being characterized as genetic risk factors for metabolic disturbances.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: LDL-c, LDL-cholesterol; TG, triglycerides; HDL-c, HDL-cholesterol; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RFLP-PCR, restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction; BMI, body mass index; OR, odds-ratio; CI, confidence interval; df, degrees of freedom.

* Corresponding author. Disciplina de Genética, UNIFESP, CEP 04023-900, São Paulo/SP, Brazil. Fax: +55 11 5576 4260/5576 4264.

E-mail addresses: dieroblezott@yaho.com.br (D.R. Mazzotti), cristiane_singulane@hotmail.com (C.C. Singulane), vanessa_kaota@yahoo.com.br (V.K. Ota), thiagopotrigh@gmail.com (T.P. Rodrigues), tuty_furuya@yahoo.com.br (T.K. Furuya), fjs351@gmail.com (F.J. de Souza), bruna_ga@hotmail.com (B.G. Cordeiro), cah_magalhaes@hotmail.com (C. Magalhães), betty.morf@epm.br (E.S. Chen), anijacomini@hotmail.com (A. Jacomini), macsmith.morf@epm.br (M.A.C. Smith), bbgalera@yahoo.com.br (B. Borsatto-Galera).

¹ Fax: +55 11 5576 4260/5576 4264.

1. Introduction

Epidemiological data have indicated a continuous increase in the world's life expectancy during the last decades, in parallel to a high prevalence of age-related diseases [1]. Cardiovascular disease represents the leading cause of death in adults worldwide. Moreover, higher prevalence of obesity, type II diabetes, dyslipidemia and other metabolic-related morbidities are considered important healthcare issues [2]. It is well-known that high LDL-cholesterol (LDL-c) and triglycerides (TG) levels and low HDL-cholesterol (HDL-c) levels are strong predictable factors for cardiovascular events [3]. Thus, a dysregulation of metabolic homeostasis, together with an inadequate diet and lifestyle habits leads to alterations in lipid and lipoprotein profiles.

The occurrence of genetic polymorphisms in genes of molecules strictly involved in regulation of fatty acid uptake and β -oxidation can have influence on lipid homeostasis, acting as risk factors for metabolic

Rapid communication

***SORL1* and *SIRT1* mRNA expression and promoter methylation levels in aging and Alzheimer's Disease**

Tatiane Katsue Furuya^a, Patrícia Natália Oliveira da Silva^a, Spencer Luiz Marques Payão^{a,b,f}, Lucas Trevizani Rasmussen^f, Roger Willian de Labio^b, Paulo Henrique Ferreira Bertolucci^c, Ianna Lacerda Sampaio Braga^a, Elizabeth Suchi Chen^a, Gustavo Turecki^d, Naguib Mechawar^d, Jonathan Mill^e, Marília de Arruda Cardoso Smith^{a,*}

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil

^b Laboratório de Genética, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Marília-SP, Brazil

^c Disciplina de Neurologia Clínica, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil

^d Psychiatry Department, Douglas Hospital Research Center, McGill University, Montreal, Canada

^e Institute of Psychiatry, King's College, London, United Kingdom

^f Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Sagrado Coração (USC), Bauru-SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2012

Received in revised form 7 July 2012

Accepted 13 July 2012

Available online 23 July 2012

Keywords:

Alzheimer's Disease

Aging

SORL1 and *SIRT1* mRNA expression

Peripheral blood leukocytes

Post mortem brain tissue

Promoter DNA methylation

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common cause of dementia among the elderly. Efforts have been made to understand the genetic and epigenetic mechanisms involved in the development of this disease. As *SORL1* (sortilin-related receptor) and *SIRT1* (sirtuin 1) genes have been linked to AD pathogenesis, we aimed to investigate their mRNA expression and promoter DNA methylation in *post mortem* brain tissues (entorhinal and auditory cortices and hippocampus) from healthy elderly subjects and AD patients. We also evaluated these levels in peripheral blood leukocytes from young, healthy elderly and AD patients, investigating whether there was an effect of age on these profiles. The comparative CT method by Real Time PCR and MALDI-TOF mass spectrometry were used to analyze gene expression and DNA methylation, respectively. *SORL1* gene was differently expressed in the peripheral blood leukocytes and might act as a marker of aging in this tissue. Furthermore, we found that *SORL1* promoter DNA methylation might act as one of the mechanisms responsible for the differences in expression observed between blood and brain for both healthy elderly and AD patients groups. The impact of these studied genes on AD pathogenesis remains to be better clarified.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is the most common cause of dementia and its prevalence increases exponentially with age. It is a heterogeneous disorder and the cause of the sporadic form is still unknown, probably caused by a complex interaction among aging,

several susceptibility genes and environmental risk factors (Blennow et al., 2006). Moreover, the epigenetic variability could affect the AD predisposition and the course of the disease in addition to these factors (Wang et al., 2008).

Some findings have linked the lipoprotein receptor *SORL1* (sortilin-related receptor; also known as LR11 or SorLA) to AD pathogenesis, based on its reduction in AD brains and its ability to lower Amyloid β ($A\beta$) levels, one of the hallmarks of this disease. *SORL1* is known to bind to apolipoprotein E (APOE), the main lipoprotein expressed in the brain. Furthermore, *APOE* $\epsilon 4$ allele is one of the main genetic risk factor associated to the sporadic form of AD (Offe et al., 2006).

Another important molecule that has been implicated in the pathogenesis of AD is *SIRT1* (sirtuin 1), member of the sirtuins family, which are protein deacetylases, essential for the regulation of various cellular functions. *SIRT1* might regulate aging and metabolic processes involved in AD and its loss has been associated with the disease progression (Julien et al., 2009). Furthermore, *SIRT1*

Abbreviations: ACTB, actin beta; AD, Alzheimer's Disease; $A\beta$, Amyloid β ; APOE, apolipoprotein E; CDR, Clinical Dementia Rating; df, degrees of freedom; DSM-IV, IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; GLM, General Linear Model; N, number of individuals; NINCDS-ADRDA, National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association; MMSE, Mini-Mental State Examination; qRT-PCR, quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RQ, relative quantification; SD, Standard deviation; *SIRT1*, sirtuin 1; *SORL1*, sortilin-related receptor.

* Corresponding author. Address: Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP/EPM Rua Botucatu, 740, Edifício Leão da Cunha – 1º andar, CEP 04023-900 São Paulo/SP, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4260; fax: +55 11 5576 4264.

E-mail address: tuty_furuya@yahoo.com.br (M. de Arruda Cardoso Smith).

ANALYSIS OF *SNAP25* mRNA EXPRESSION AND PROMOTER DNA METHYLATION IN BRAIN AREAS OF ALZHEIMER'S DISEASE PATIENTS

T. K. FURUYA,^a P. N. O. SILVA,^a S. L. M. PAYÃO,^{a,c,f}
P. H. F. BERTOLUCCI,^b L. T. RASMUSSEN,^f
R. W. DE LABIO,^c I. L. S. BRAGA,^a E. S. CHEN,^a
G. TURECKI,^d N. MECHAWAR,^d J. MILL^e AND
M. A. C. SMITH^{a,*}

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil

^b Disciplina de Neurologia Clínica, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil

^c Laboratório de Genética, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Marília-SP, Brazil

^d Psychiatry Department, Douglas Hospital Research Center, McGill University, Montreal, Canada

^e Institute of Psychiatry, King's College, London, United Kingdom

^f Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Sagrado Coração (USC), Bauru-SP, Brazil

Abstract—Alzheimer's Disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly people. The presynaptic terminal is an important site of pathological changes in AD, leading to synaptic loss in specific brain regions, such as in the cortex and hippocampus. In this study, we investigated synaptosomal-associated protein, 25-kDa (*SNAP25*) mRNA levels and promoter DNA methylation in *post mortem* brain tissues (entorhinal and auditory cortices and hippocampus) from healthy elderly and AD subjects as well as in peripheral blood leukocytes of young, healthy elderly and AD patients. mRNA quantification was performed by quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) using the $\Delta\Delta C_T$ method and promoter DNA methylation was quantified by mass spectrometry using the Sequenom EpiTYPER platform. We observed a significant decrease in *SNAP25* expression in AD across all the three brain regions in relation to the healthy elderly subjects, suggesting impairment

in synaptic function. The changes in the auditory cortex reflected those observed in the hippocampus and entorhinal cortex, the primary areas affected in AD. However, no AD-associated differences in *SNAP25* promoter DNA methylation were observed suggesting that other mechanisms may be involved in mediating the observed gene expression changes. © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: aging, Alzheimer's Disease, promoter DNA methylation, *post mortem* brain tissue, *SNAP25* gene expression, synaptic impairment.

INTRODUCTION

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the major cause of cognitive decline among the elderly population (Papassotiropoulos et al., 2006). It is the most common form of dementia, with progressive impairment of episodic memory that becomes more severe and, eventually, incapacitating. Other common symptoms include delusions, confusion, poor judgment and decision-making, agitation as well as language disturbances (Blennow et al., 2006; Bird, 2008).

Neuropathologically, AD is characterized by extracellular deposits of β -amyloid (β A) (senile plaques) and the accumulation of hyper-phosphorylated tau protein (neurofibrillary tangles) in the brain (Blennow et al., 2006). Furthermore, anatomic structural changes are also relevant during the course of the disease. Significant atrophy of some brain regions is observed in the early stages of the disease, mainly in the hippocampal formation and entorhinal cortex (Hampel et al., 2008). Because memory formation depends on the presence of an intact entorhinal–hippocampal circuit, it is not surprising that this network is severely impaired in AD (Harris et al., 2010).

This heterogeneous and complex disorder can be classified as familial or sporadic. The familial form of the disease is a rare autosomal dominant disorder with onset before age 65 years, resulting from mutations in the amyloid precursor protein (*APP*), presenilin 1 (*PSEN1*) and presenilin 2 (*PSEN2*) genes. The ϵ 4 allele of apolipoprotein E (*APOE*) gene is the most important risk factor in the sporadic form of AD, which might act with several other susceptibility genes, each conferring only a minor increase in risk, in a complex interaction with environmental factors (Blennow et al., 2006). Recent large-scale genome-wide association studies have identified some novel susceptibility loci, such as *CLU*, *PICALM*, *CR1* and *BIN1*

*Corresponding author. Address: Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP/EPM, Rua Botucatu, 740, Edifício Leão da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo-SP, Brazil. Tel: +55-11-5576-4260; fax: +55-11-5576-4264.

E-mail address: tuty_furuya@yahoo.com.br (M. A. C. Smith).

Abbreviations: AD, Alzheimer's Disease; APOE, apolipoprotein E; APP, amyloid precursor protein; bp, base pair; CDR, clinical dementia rating; C_T , cycle threshold; df, degrees of freedom; DSM-IV, IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; F, female; GLM, general linear model; M, male; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; MMSE, Mini-Mental State Examination; N, number of individuals; NINCDS-ADRDA, National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke–Alzheimer's Disease and Related Disorders Association; PCR-RFLP, Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism; PSEN1, presenilin 1; PSEN2, presenilin 2; qRT-PCR, quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RQ, relative quantification; SD, standard deviation; SNAP25, synaptosomal-associated protein, 25 kDa; β A, β -amyloid.

Association of *APOA1* and *APOA5* polymorphisms and haplotypes with lipid parameters in a Brazilian elderly cohort

T.K. Furuya¹, E.S. Chen¹, V.K. Ota¹, D.R. Mazzotti¹, L.R. Ramos²,
M.S. Cendoroglo², L.Q. Araujo², R.R. Burbano¹ and M.A.C. Smith¹

¹Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética,
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

²Disciplina de Geriatria e Gerontologia, Departamento de Medicina,
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Corresponding author: M.A.C. Smith

E-mail: tuty_furuya@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 12 (3): 3495-3499 (2013)

Received July 11, 2012

Accepted November 10, 2012

Published February 28, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.February.28.7>

ABSTRACT. Apolipoproteins have an important role in lipid metabolism and transport. Polymorphisms in the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster have been associated with lipid alterations and cardiovascular diseases. We investigated *APOA1* *Xmn*I, *APOA5* S19W, and *APOA5* -1131T>C polymorphisms in 377 individuals from a cohort of a longitudinal Brazilian elderly study. Allele frequencies, genotype distribution, and association with major morbidities as well as with lipids, creatinine, albumin, urea, glycated hemoglobin, and fasting glucose serum levels were investigated. Linkage disequilibrium and haplotype associations were also analyzed. This is the first time that haplotypes involving these polymorphisms were evaluated. Genotyping was performed by PCR-RFLP. Minor allele frequencies were 0.119, 0.071, and 0.158 for *Xmn*I, S19W, and -1131T>C polymorphisms, respectively. We found a significant association of the -1131C allele with low LDL-C levels. We also observed that *Xmn*I

CNP and *DPYSL2* mRNA Expression and Promoter Methylation Levels in Brain of Alzheimer's Disease Patients

Patrícia Natalia Silva^a, Tatiane Katsue Furuya^a, Ianna Sampaio Braga^a, Lucas Trevizani Rasmussen^c, Roger Willian de Labio^c, Paulo Henrique Bertolucci^b, Elizabeth Suchi Chen^a, Gustavo Turecki^d, Naguib Mechawar^d, Spencer Luiz Payão^{a,c}, Jonathan Mill^e and Marília Cardoso Smith^{a,*}

^a*Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil*

^b*Disciplina de Neurologia Clínica, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil*

^c*Laboratório de Genética, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Marília, SP, Brazil*

^d*Psychiatry Department, Douglas Hospital Research Center, McGill University, Montreal, Canada*

^e*Institute of Psychiatry, King's College, London, UK*

Accepted 31 July 2012

Abstract. Alzheimer's disease (AD) is a highly prevalent type of dementia in the elderly population. AD is a complex neurodegenerative disorder. Thus, epigenetic mechanisms that regulate gene expression might have an important role in AD. *CNP* (2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase) gene encodes a protein used as an index of myelin alterations. *DPYSL2* (Dihydropyrimidinase-like 2) is described as acting in structural and regulatory processes in the central nervous system, such as neural differentiation, neurotransmitter release, and stabilization of microtubules. In this study, we evaluated gene expression and epigenetic regulation of *CNP* and *DPYSL2* genes in three postmortem brain regions (entorhinal and auditory cortices and hippocampus) of AD patients and healthy elderly controls. mRNA quantification was performed using qRT-PCR, and promoter DNA methylation patterns were determined by mass spectrometry using the Sequenom EpiTYPER platform. We observed *CNP* mRNA downregulation in entorhinal and auditory cortex in relation to the same regions of the control group. *CNP* alterations in the brain might suggest impairment in myelination leading to a synaptic and cognition loss. No AD-associated differences in *CNP* and *DPYSL2* promoter DNA methylation were observed, suggesting that other mechanisms may be involved in mediating the observed *CNP* gene expression.

Keywords: *CNP*, *DPYSL2*, epigenetics, gene expression, mRNA

Supplementary data available online: <http://www.j-alz.com/issues/33/vol33-2.html#supplementarydata03>

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that affects the cortex and hippocampus and

is characterized by the accumulation of the hyperphosphorylated form of the microtubular tau protein (neurofibrillary tangles, NFT) and amyloid- β (A β) protein (senile plaques) as well as neuronal loss [1]. Neuronal connections, dendrites, and synapses seem to degenerate in cortex and hippocampus of AD patients [2].

There are both familial and sporadic forms of AD. Gene mutations in *PSEN1*, *PSEN2*, and *APP* are associated with familial cases, and the presence of

*Correspondence to: Prof. Dr. Marília de Arruda Cardoso Smith, Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP/EPM, Rua Botucatu, 740, Edifício Leão da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel./Fax: +5511 5576 4260/5576 4264; E-mail: macsmith.morf@epm.br.

Polymorphisms in the *p27^{kip-1}* and *prohibitin* genes denote novel genes associated with melanoma risk in Brazil, a high ultraviolet index region

Guilherme Francisco^{a,f,*}, Fernanda T. Gonçalves^{b,*}, Olinda C. Luiz^c, Renata F. Saito^{a,f}, Rodrigo A. Toledo^d, Tomoko Sekiya^d, Tharcísio C. Tortelli Jr^{a,f}, Esther D.V.B. Violla^{a,f}, Tatiane K. Furuya Mazzotti^{a,f}, Priscila D.R. Cirilo^{a,f}, Cyro Festa-Neto^e, José A. Sanches^e, Gilka J.F. Gattás^b, José Eluf-Neto^c and Roger Chammas^{a,f}

Ultraviolet (UV) radiation is a major environmental risk factor to the development of cutaneous melanoma as it induces pyrimidine dimers in DNA. Genes that exert their function by arresting the cell cycle are critical to avoid carcinogenic mutations, allowing the processing of DNA repair systems. This study was carried out to evaluate the role of polymorphisms in cell cycle genes such as *TP53*, *p27^{kip-1}*, *CDKN2A*, *prohibitin*, and *GADD153* in melanoma risk as well as their influence on known risk factors in a high UV index region. A hospital-based case-control study was carried out in Brazil to evaluate the contribution of polymorphisms in cell cycle genes toward melanoma risk. The study comprised 202 melanoma patients and 210 controls. The polymorphisms analyzed were *TP53* Arg72Pro, *p27^{kip-1}* Val109Gly, *GADD153* Phe10Phe (rs697221), *CDKN2A* 3'UTR C540G, and *prohibitin* 3'UTR C1703T. As regards, *p27^{kip-1}* Val109Gly, both heterozygous and homozygous Gly genotypes were shown to be protective genotypes on calculating both crude and adjusted odds ratios (ORs) for age, sex, and educational level [OR 0.37; 95% confidence interval (CI) 0.16–0.87; $P < 0.05$]. Similarly, the *prohibitin* TT genotype increased melanoma risk in the crude and adjusted analyses (OR 2.40; 95% CI 1.10–5.26; $P < 0.05$). The *p27^{kip-1}* Gly protective genotype decreased the risk for melanoma in a stratified analysis of the known risk factors such as

hair and eye color, sunburns, pigmented lesions, and European ancestry. The *prohibitin* TT genotype increased the risk of melanoma by such host factors. Our results showed for the first time that polymorphisms in *p27^{kip-1}* Val109Gly and in *prohibitin* 3'UTR C1703T genotypes modulate the risk to melanoma in a high UV index region. *Melanoma Res* 23:231–236 © 2013 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Melanoma Research 2013, 23:231–236

Keywords: case-control, melanoma, p27, polymorphism, prohibitin

^aExperimental Oncology Laboratory, Medical Investigation Laboratory, Unit 24, Department of Radiology, ^bMedical Investigation Laboratory, Unit 40, Department of Legal Medicine, Medical Ethics, Social and Occupational Medicine, ^cMedical Investigation Laboratory, Unit 38, Department of Preventive Medicine, ^dEndocrine Genetics Unit, Medical Investigation Laboratory, Unit 25, Department of Internal Medicine, Endocrinology, ^eDepartment of Dermatology and ^fCenter for Translational Oncology, São Paulo State Cancer Institute (ICESP), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to Roger Chammas, MD, PhD, Center for Translational Oncology – São Paulo State Cancer Institute (ICESP), School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 251, 8th Floor, São Paulo 01246-000, Brazil
Tel: +55 11 3893 3549; fax: +55 11 3893 3024;
e-mail: rchammas@lim24.fm.usp.br

*Guilherme Francisco and Fernanda T. Gonçalves contributed equally to the writing of this article.

Received 31 July 2012 Accepted 10 March 2013

Introduction

Sun exposure is a major environmental factor to the development of melanomas and nonmelanoma skin cancers. Its carcinogenic potential is related to the exposure to ultraviolet B (UVB) light (290–320 nm), because of its ability to cause DNA damage through the formation of pyrimidine dimers directly in addition to the induction of reactive oxygen species [1]. DNA damage leads to diverse cellular responses such as activation of DNA repair systems and/or induction of senescence or

apoptosis in a case of repair failure [2]. However, for either fate of the cell after DNA damage, cell cycle arrest is a critical step. Such an arrest may occur during the transition from the G1 to S phase, G2 phase to mitosis, or even during mitotic phases.

Several proteins act in cell cycle arrest and are related to cancer development, such as p53, *p27^{kip-1}*, p21, p16, and p14 (both coded from *CDKN2A* locus), and most of them are related to the p53 pathway [3]. Cell cycle arrest proteins are critical to melanoma development and are frequently mutated in familial and sporadic melanomas, for example, p16 [4], *p27^{kip-1}* [5], and p53 proteins [6].

All supplementary digital content is available directly from the corresponding author.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Deregulated expression of Nucleophosmin 1 in gastric cancer and its clinicopathological implications

Mariana Ferreira Leal^{1,2*}, Tatiane Katsue Furuya Mazzotti^{3,4}, Danielle Queiroz Calcagno^{1,5}, Priscila Daniele Ramos Cirilo^{3,4}, Margarita Cortes Martinez^{3,4}, Samia Demachki⁵, Paulo Pimentel Assumpção⁵, Roger Chammas^{3,4}, Rommel Rodríguez Burbano⁶ and Marília Cardoso Smith¹

Abstract

Background: The process of gastric carcinogenesis still remains to be elucidated. The identification of genes related to this process may help to reduce mortality rates through early diagnosis and the development of new anticancer therapies. Nucleophosmin 1 (NPM1) acts in ribosome biogenesis, centrosome duplication, maintenance of genomic stability, and embryonic development. Recently, NPM1 has been implicated in the tumorigenesis processes. Here, we evaluated NPM1 gene and protein expression in gastric tumors and in corresponding non-neoplastic gastric samples.

Methods: NPM1 protein expression was determined by Western blot in 17 pairs of gastric tumors and corresponding non-neoplastic gastric tissue. The protein immunoreactivity was observed in 12 tumor samples. mRNA expression was evaluated by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in 22 pairs of gastric tumors and in matched non-neoplastic gastric tissue.

Results: NPM1 protein expression was significantly reduced in gastric cancer samples compared to matched non-neoplastic gastric samples ($P = 0.019$). The protein level of NPM1 was reduced at least 1.5-fold in 35% of tumors compared to paired non-neoplastic gastric tissue. However, NPM1 immunoreactivity was detected in neoplastic and non-neoplastic cells, including in intestinal metaplastic, gastritis and inflammatory cells. NPM1 was mainly expressed in nucleus and nucleolus subcellular compartments. The staining intensity and the percentage of immunoreactive cells varied among the studied cases. The *NPM1* mRNA level was reduced at least 1.5-fold in 45.5% of samples and increased in 27.3% of samples. An inverse correlation between protein and mRNA expression was detected ($r = -0.509$, $P = 0.037$). Intestinal-type gastric cancer presented higher mRNA levels than diffuse-type ($P = 0.026$). However, reduced NPM1 protein expression was associated with intestinal-type gastric cancer compared to matched non-neoplastic gastric samples ($P = 0.018$). In addition, tumors from patients with known distant metastasis presented reduced NPM1 protein levels compared to tumors from patients without distant metastasis ($P < 0.001$).

Conclusion: Although the expression of NPM1 is heterogeneous in gastric tumors, our results suggest that NPM1 down-regulation may have a role in gastric carcinogenesis and may help in the selection of anticancer treatment strategies.

Keywords: Gastric cancer, Nucleophosmin, Gene expression, Protein expression

* Correspondence: mariana.morf@epm.br

¹Genetics Division, Department of Morphology and Genetic, Federal University of São Paulo, R. Botucatu, 740, São Paulo, SP CEP 04023-900, Brazil

²Department of Orthopedics and Traumatology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP 04038-031, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Short Communication

Association of APOE, GCPII and MMP9 polymorphisms with common diseases and lipid levels in an older adult/elderly cohort

Diego Robles Mazzotti^{a,1}, Cristiane Carvalho Singulane^b, Vanessa Kiyomi Ota^{a,1}, Thiago Potrich Rodrigues^b, Tatiane Katsue Furuya^{a,1}, Fernando José de Souza^b, Bruna Grassiela Cordeiro^b, Camilla Magalhães de Oliveira Amaral^b, Elizabeth Suchi Chen^{a,1}, Anielli Jacomini^b, Marília de Arruda Cardoso Smith^{a,*}, Bianca Borsatto-Galera^c

^a Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu, 740, Edifício Leitão da Cunha, 1º andar, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil

^b Unidade de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

^c Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 19 November 2013

Available online 28 November 2013

Keywords:

APOE

GCPII

MMP9

Polymorphisms

LDL-cholesterol

Lipid levels

ABSTRACT

Background and aims: The characterization of candidate gene polymorphisms in elderly populations is an important tool for the identification of risk factors for age-related diseases and conditions. We aimed to genotype the APOE polymorphisms (rs429358 and rs7412), rs61886492 (1561C>T) and rs202720 of GCPII gene and rs3918242 (–1562C>T) of MMP9 gene in an older-adult/elderly cohort from Cuiabá city, Mato Grosso Brazil as well as to characterize risk factors for morbidities and conditions affecting this cohort.

Methods: The studied population consisted of 570 subjects from Cuiabá city, Brazil, who were subjected to clinical interviews and blood collection for laboratory examinations and DNA extraction. Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR), sequence-specific primer PCR (SSP-PCR) and TaqMan® allelic discrimination assay were used for genotyping.

Results: The frequencies of APOE ε2 and ε4 were 6.6% and 14.8%, respectively, and the frequencies of GCPII rs61886492 T allele, GCPII rs202720 C allele and MMP9 rs3918242 T allele were, respectively, 3.0%, 26.6% and 10.1%. Significant associations between APOE ε2 allele with lower total cholesterol and LDL-cholesterol were found. In addition, MMP9 rs3918242 T allele was associated with higher LDL-cholesterol levels, suggesting a link between lipid metabolism alteration and cardiovascular disease.

Conclusions: The present findings contributed to characterize risk factors specific for the studied population and to better understand the molecular physiopathology of common morbidities and conditions affecting older-adult/elderly people.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

It is well established that the higher life expectancy that occurred in the last decades led to the aging of the population at global level (Burkle et al., 2007). This fact has contributed to the increase of the prevalence of several age-related diseases, which demands valuable costs from

health care systems. As an alternative for the early detection of such diseases, molecular epidemiology methods have been developed and applied in several populations worldwide (Thomas et al., 2009). The characterization of candidate gene polymorphisms has been frequently used to determine risk factors for many diseases and conditions (Capri et al., 2006; Chen et al., 2010, 2011; Devlin et al., 2000; Mazzotti et al., 2011).

Apolipoprotein E (APOE) is one of the major components of plasma lipoproteins and its function is related to stabilization, solubilization and transport of lipids and cholesterol in the circulation (Hatters et al., 2006). The APOE gene is located in chromosome 19q13.2 and contains the most thoroughly studied polymorphisms, with three common alleles: ε2, ε3 and ε4, which result in differential amino acid residuals at positions 112 (rs429358) and 158 (rs7412) of the polypeptidic chain (Eichner et al., 2002). The APOE polymorphisms have been associated with several conditions such as cardiovascular diseases (CVD), lipid

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; APOE, apolipoprotein E; BMI, body mass index; CI, confidence interval; CVD, cardiovascular disease; GCPII, glutamate carboxipeptidase II; HWE, Hardy Weinberg Equilibrium; MMP9, matrix metalloproteinase; OR, odds ratio; RFLP-PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction; SNP, Single nucleotide polymorphism; SSP-PCR, Sequence-Specific Primer Polymerase Chain Reaction.

* Corresponding author at: Disciplina de Genética, UNIFESP, CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4260; fax: +55 11 5576 4264.

E-mail address: macsmith.mor@epm.br (M. de Arruda Cardoso Smith).

¹ Tel.: +55 11 5576 4260; fax: +55 11 5576 4264.

Analysis of *HSPA8* and *HSPA9* mRNA Expression and Promoter Methylation in the Brain and Blood of Alzheimer's Disease Patients

Patricia Natalia Silva^a, Tatiane Katsue Furuya^a, Ianna Lacerda Braga^a, Lucas Trevizani Rasmussen^c, Roger Willian Labio^c, Paulo Henrique Bertolucci^b, Elizabeth Suchi Chen^a, Gustavo Turecki^d, Naguib Mechawar^d, Spencer Luiz Payão^{a,c}, Jonathan Mill^e and Marília Cardoso Smith^{a,*}

^a*Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil*

^b*Disciplina de Neurologia Clínica, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil*

^c*Laboratório de Genética, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Marília, SP, Brazil*

^d*Psychiatry Department, Douglas Hospital Research Center, McGill University, Montreal, Canada*

^e*Institute of Psychiatry, King's College, London, UK*

Accepted 1 July 2013

Abstract. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in elderly. Chaperones may have a crucial role in AD due to their involvement in protein quality control, folding, and degradation. In this study, we investigated the mRNA and promoter DNA methylation levels of two chaperones, *HSPA8* and *HSPA9*, in postmortem brain tissue (entorhinal and auditory cortices and hippocampus) from healthy elderly and AD subjects as well as in peripheral blood of healthy elderly and AD patients. mRNA quantification was performed by qRT-PCR and DNA methylation by mass spectrometry. In the peripheral blood, we did not observe a significant difference in *HSPA8* and *HSPA9* expression between elderly controls and AD. A significant downregulation of *HSPA8* and *HSPA9* was observed in AD across the three brain regions compared to the controls, suggesting their participation in AD pathogenesis. However, no important DNA methylation differences were observed, suggesting that other mechanism may be involved in controlling these genes expression.

Keywords: epigenetics, gene expression, *HSPA8*, *HSPA9*, mRNA

INTRODUCTION

Molecular chaperones (or heat shock proteins, HSPs) are evolutionarily conserved proteins that play an important role in cell survival through cytoprotective mechanisms [1]. Under conditions of stress, cells

respond by upregulating the expression of HSPs, which helps reverse stress-induced protein misfolding [2].

The HSP70 chaperones (heat shock protein 70 kDa) or HSPAs have a role in protein folding, protein transport, protein targeting, protein degradation, and signal transduction [3]. Reduced expression of the chaperone HSP70 family leads to apoptosis by decreasing caspase cascade activation and kinase signaling pathways [4], indicating that loss of expression of HSPAs should play a critical role in the neuronal death associated with neurodegenerative diseases [5].

*Correspondence to: Prof. Dr. Marília Cardoso Smith, Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP/EPM, Rua Botucatu, 740 – Edifício Leão da Cunha – 1º andar, CEP 04023-900 – São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 5576 4260; Fax: +55 11 5576 4264; E-mail: macsmith.morf@epm.br.

OPEN ACCESS

Citation: Bonifaz-Peña V, Contreras AV, Struchiner CJ, Roela RA, Furuya-Mazzotti TK, et al. (2014) Exploring the Distribution of Genetic Markers of Pharmacogenomics Relevance in Brazilian and Mexican Populations. PLoS ONE 9(11): e112640. doi:10.1371/journal.pone.0112640

Editor: Yan Gong, University of Florida, United States of America

Received: July 8, 2014

Accepted: October 9, 2014

Published: November 24, 2014

Copyright: © 2014 Bonifaz-Peña et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: FUNDERS: (1) Funding supported by Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico (CNPq) CNPq no. 304063/2011-8, <http://www.cnpq.br> (GS-K). (2) Funding supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) FAPERJ no. E-26/102796/2012, URL: <http://www.faperj.br>; FAPERJ no. E-26/110683/2012, URL: <http://www.faperj.br> (GS-K). (3) Funding supported by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) FINEP no. 01.08.0123.00, URL: <http://www.finep.gov.br> (GS-K). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. SPONSORSHIPS: (1) The Affymetrix DMETplus chips were provided by the Pharmacogenetics for every nation initiative (PGENI), a USA-based global health non-profit organization. PGENI is supported by individual donors and does not solicit funding from health care-oriented companies. (2) The Affymetrix DMET Plus array data for the European, African and East Asian HapMap samples were provided by Affymetrix Inc.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following competing interests to declare: Co-author Roger Chammas has a potential conflict of interest as a member of the academic editorial board of the journal. Co-author Laura Uribe-Figueroa is an employee of the commercial company Affymetrix Inc. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

RESEARCH ARTICLE

Exploring the Distribution of Genetic Markers of Pharmacogenomics Relevance in Brazilian and Mexican Populations

Vania Bonifaz-Peña¹, Alejandra V. Contreras², Claudio Jose Struchiner³, Rosimeire A. Roela⁴, Tatiane K. Furuya-Mazzotti⁴, Roger Chammas⁴, Claudia Rangel-Escareño^{1,10}, Laura Uribe-Figueroa^{5a}, María José Gómez-Vázquez^{1ab}, Howard L. McLeod^{6,11}, Alfredo Hidalgo-Miranda⁷, Esteban J. Parra^{8,9}, Juan Carlos Fernández-López^{1*}, Guilherme Suarez-Kurtz^{9*}

1. Computational Genomics Consortium, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico, 2. Nutrigenetics and Nutrigenomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico, 3. Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 4. Departamento de Radiologia e Oncologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, 5. Genotyping and Expression Analysis Unit, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico, 6. DeBartolo Family Personalized Medicine Institute, University of South Florida Moffitt Cancer Center, Tampa, Florida, United States of America, 7. Cancer Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico, 8. Department of Anthropology, University of Toronto at Mississauga, Mississauga, Ontario, Canada, 9. Divisão de Farmacologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 10. Institute of Mathematical Sciences, Claremont Graduate University, Claremont, California, United States of America, 11. Pharmacogenomics Department, Pharmacogenetics for Every Nation Initiative, Tampa, Florida, United States of America

*jfernandez@inmegen.gob.mx (JCFL); kurtz@inca.gov.br (GSK)

These authors contributed equally to this work.

^a Current address: Latin America Marketing, Affymetrix Incorporation, Santa Clara, California, United States of America

^{ab} Current address: Department of Applied Mathematics and Theoretical Physics, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Abstract

Studies of pharmacogenomics-related traits are increasingly being performed to identify loci that affect either drug response or susceptibility to adverse drug reactions. However, the effect of the polymorphisms can differ in magnitude or be absent depending on the population being assessed. We used the Affymetrix Drug Metabolizing Enzymes and Transporters (DMET) Plus array to characterize the distribution of polymorphisms of pharmacogenetics and pharmacogenomics (PGx) relevance in two samples from the most populous Latin American countries, Brazil and Mexico. The sample from Brazil included 268 individuals from the southeastern state of Rio de Janeiro, and was stratified into census categories. The sample from Mexico comprised 45 Native American Zapotecas and 224 self-identified Mestizo individuals from 5 states located in geographically distant regions in Mexico. We evaluated the admixture proportions in the Brazilian and Mexican samples using a

Prohibitin Expression Deregulation in Gastric Cancer Is Associated with the 3' Untranslated Region 1630 C>T Polymorphism and Copy Number Variation

Mariana Ferreira Leal^{1,2,*}, Priscila Daniele Ramos Cirilo^{3,4}, Tatiane Katsue Furuya Mazzotti^{3,4}, Danielle Queiroz Calcagno^{1,5}, Fernanda Wisnieski¹, Samia Demachki⁵, Margarita Cortes Martinez^{3,4}, Paulo Pimentel Assumpção⁵, Roger Chammas^{3,4}, Rommel Rodríguez Burbano⁶, Marília Cardoso Smith¹

1 Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **2** Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **3** Laboratório de Oncologia Experimental, Departamento de Radiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **4** Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **5** Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil, **6** Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

Abstract

PHB is a reported oncogene and tumor suppressor in gastric cancer. Here, we evaluated whether the *PHB* copy number and the rs6917 polymorphism affect its expression in gastric cancer. Down-regulation and up-regulation of *PHB* were observed in the evaluated tumors. Reduced expression was associated with tumor dedifferentiation and cancer initiation. The T allele of the rs6917 polymorphism was associated with reduced *PHB* mRNA levels. Moreover, the up-regulation of *PHB* appeared to be regulated by the gain of additional gene copies. Thus, *PHB* copy number variation and differential expression of the rs6917 polymorphism may play a role in *PHB* transcriptional regulation.

Citation: Leal MF, Cirilo PDR, Mazzotti TKF, Calcagno DQ, Wisnieski F, et al. (2014) Prohibitin Expression Deregulation in Gastric Cancer Is Associated with the 3' Untranslated Region 1630 C>T Polymorphism and Copy Number Variation. PLoS ONE 9(5): e98583. doi:10.1371/journal.pone.0098583

Editor: Amanda Ewart Toland, Ohio State University Medical Center, United States of America

Received: February 17, 2014; **Accepted:** May 5, 2014; **Published:** May 30, 2014

Copyright: © 2014 Leal et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; RC, MACS and RRB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; MFL, PDR and DQC) as grants and fellowship awards. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: RC is an Academic Editor for PLOS ONE. The others authors have declared that no competing interests exist for them. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE Editorial policies and criteria.

* E-mail: mariana.morf@epm.br

Introduction

Gastric cancer (GC) is the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer-related deaths worldwide [1]. Despite significant advances in the study of GC, the molecular alterations involved in gastric carcinogenesis remain unknown.

Chromosome 17 is one of the most common chromosomes exhibiting numerical aberrations in GC (see review [2]). Our group has previously reported the presence of chromosome 17 aneuploidy, both gains and losses, in GC in individuals in Northern Brazil [3,4,5,6] and in all GC cell lines established from neoplasias in this population [7,8]. Therefore, this chromosome may contain important genes involved in gastric carcinogenesis.

The prohibitin-1 (*PHB*) gene maps to the chromosome 17q21 locus. This gene encodes a ubiquitous, evolutionarily conserved protein that is found in a wide range of organisms, including bacteria, plants, yeast, protozoans and mammals [9]. *PHB* was originally thought to play a central role in the inhibition of cell-cycle progression. More recently, *PHB* has been characterized as a chaperone involved in the stabilization of mitochondrial proteins; thus, *PHB* has been implicated in several cellular processes, including the regulation of proliferation, apoptosis and gene transcription [10].

PHB appears to play a role in the development of different types of cancer. Overexpression of *PHB* has been reported in cancer of the cervix, esophagus, breast, lung, bladder, thyroid, ovary and prostate. In contrast, reduced *PHB* expression has been observed in gliomas, and somatic mutations in *PHB* have been detected in sporadic breast cancers [9]. In addition, a functional single nucleotide polymorphism (SNP) in the *PHB* gene, changing a cytosine to a thymine at position 1630 in the 3' UTR (rs6917), creates a variant that lacks antiproliferative activity [11,12] and subsequently may increase the risk of malignant growth. The T allele of this SNP has been associated with an increased risk of breast cancer [13] and melanoma [14]. Therefore, the role of *PHB* in cancer proliferation and/or suppression remains controversial.

The role of *PHB* in gastric carcinogenesis has not been fully elucidated. Some previous studies have described increased *PHB* expression in GC samples [15,16,17,18] and the serum of GC patients [19]. However, other studies have reported *PHB* down-regulation in this type of cancer [20,21]. The investigation of the molecular mechanisms involved in the transcriptional regulation of *PHB* may provide new insights into its role in GC and aid the development of new anticancer treatments.

In this study, we first evaluated the mRNA and protein expression of *PHB* in GC and matched non-neoplastic gastric tissue samples. In addition, the possible associations between *PHB*

Effect of *APOE* and *CHRNA7* Genotypes on the Cognitive Response to Cholinesterase Inhibitor Treatment at Different Stages of Alzheimer's Disease

American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®
2015, Vol. 30(2) 139-144
© The Author(s) 2014
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1533317514539540
aja.sagepub.com

Ianna Lacerda Sampaio Braga, MD¹, Patricia Natalia Silva, PhD¹,
Tatiane Katsue Furuya, MSc¹, Leonardo Caires Santos, MSc¹,
Belisa Caldana Pires, BCh¹, Diego Robles Mazzotti, PhD¹,
Paulo Henrique Bertolucci, PhD², Maysa Seabra Cendoroglo, PhD³,
and Marília Cardoso Smith, PhD¹

Abstract

The loss of cholinergic transmission is considered to be an important cause of Alzheimer's disease (AD). Treatment with acetylcholinesterase inhibitors (ChEIs) shows benefits; however, great heterogeneity has been observed in patient responses. We evaluated apolipoprotein E (*APOE*) and $\alpha 7$ nicotinic receptor (*CHRNA7*) single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and associated these SNPs with pharmacological responses to ChEIs in a Brazilian population with AD. We studied 177 outpatients using ChEIs, and they were classified as responders and nonresponders according to variation in Mini-Mental State Examination (MMSE) status. The analysis of *APOE* genotypes showed that patients with the $\epsilon 4$ allele had a worse response than those without the $\epsilon 4$ allele. We observed an association between the *CHRNA7* T allele and a better response to treatment with ChEIs in patients with mild AD (MMSE ≥ 20). The SNP rs6494223 of *CHRNA7* as well as *APOE* $\epsilon 4$ could be useful for understanding the response to ChEI treatment in patients with AD.

Keywords

pharmacogenomics, Alzheimer's disease, cholinesterase inhibitor, *CHRNA7*, *APOE*

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia affecting older people and is associated with the loss of cholinergic neurons in parts of the brain.^{1,2} Acetylcholinesterase inhibitors (ChEIs) such as donepezil, galantamine, and rivastigmine prevent the breakdown of acetylcholine (ACh) released into synaptic clefts and thus enhance cholinergic neurotransmission.³ There is no disease-modifying therapy for AD yet. The target of drug therapy in AD is based on the improvement, stabilization, and retardation of cognitive decline, enhancement of behavioral symptoms, and reduction in caregiver burden.⁴

Most studies have reported interindividual differences in drug response that may be due to variability in drug metabolism related to clinical, behavioral, and genetic factors and mainly hereditary polymorphisms.⁵ Apolipoprotein E (*APOE*) is a primary genetic risk factor for AD.⁶ Polymorphic variants of the *APOE* gene (19q13.2) are associated with a risk-conferring allele of the gene (encoding *APOE* $\epsilon 4$) or confer protection from AD (*APOE* $\epsilon 2$).⁷ A higher frequency of responders has been observed in non- $\epsilon 4$ bearers and males,^{8,9} indicating that

gender could be a more powerful determinant of short-term outcome to ChEI treatment than *APOE* status. In contrast, other studies do not support the hypothesis that *APOE* and gender are predictors for the therapeutic response of patients with AD to tacrine or donepezil.^{10,11} The absence of at least 1 $\epsilon 4$ allele and a specific gender are not predictive of the response to donepezil treatment in AD.¹¹ Petersen et al¹² showed that *APOE* $\epsilon 4$ carriers exhibited a better response to donepezil in mild cognitive

¹ Disciplina de Genética, Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil

² Disciplina de Neurologia Clínica, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil

³ Disciplina de Geriatria e Gerontologia, Departamento de Medicina (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil

Corresponding Author:

Marília Cardoso Smith, PhD, Department of Morphology and Genetics, Universidade Federal de São Paulo, 740 Botucatu St, Ed. Leitão da Cunha, Vila Clementino, São Paulo-SP, Brazil.
Email: macsmith.morf@epm.br

Good Response to Long-Term Therapy with Growth Hormone in a Patient with 9p Trisomy Syndrome: A Case Report and Review of the Literature

Ana Pinheiro Machado Canton,¹ Mirian Yumie Nishi,² Tatiane Katsue Furuya,³ Rosimeire Aparecida Roela,³ and Alexander Augusto Lima Jorge^{1*}

¹Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM/25, Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³Laboratório de Oncologia Experimental LIM/24, Departamento de Radiologia e Oncologia, Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (CTO/ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brazil

Manuscript Received: 9 August 2015; Manuscript Accepted: 8 December 2015

The 9p trisomy syndrome is a rare condition, clinically characterized by a wide range of dysmorphic features, intellectual disability, and, in most patients, by short stature. Recombinant human growth hormone (rhGH) therapy is still controversial in syndromic disorders, the reason for which it is not currently indicated. Here we report a 7-year-old boy with 9p trisomy syndrome and marked short stature. Results of routine laboratory assessments were normal. IGF1 and IGFBP3 levels were both in the normal range (−1.6 and −0.7 SDS, respectively). GH peak in response to oral clonidine stimulation test was 3.5 µg/L, which is considered a normal response. Chromosomal analysis revealed the karyotype 47,XY, + del(9)(pter-q11): dn. SNP array data indicated absence of mosaicism [arr 9p24.3–p13.1 (203,861–38,787,480) x3]. By the age of 8.3 years, the patient had persistent short stature (−2.9 SDS) with normal growth velocity (4.9 cm/y; −0.7 SDS), not showing spontaneous catch-up. After 5.6 years of rhGH therapy (50 µg/kg/d), height SDS improved from −2.9 to −1.0. This result suggests that rhGH therapy could be considered for patients with 9p trisomy syndrome who present with short stature. The degree of intellectual disability and the potential for social inclusion should be taken into account when recommending this treatment. Additional studies are needed to establish the benefits of height gain in these patients.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: 9p trisomy syndrome; syndromic short stature; growth hormone; SNP array

INTRODUCTION

The 9p trisomy syndrome is a relatively rare condition in live born infants that can be caused by partial or complete 9p trisomy [Temtam et al., 2007; Bouhjar et al., 2011]. Since its first description

How to Cite this Article:

Canton APM, Nishi MY, Furuya TK, Roela RA, Jorge AAL. 2016. Good response to long-term therapy with growth hormone in a patient with 9p trisomy syndrome: A case report and review of the literature.

Am J Med Genet Part A 170A:1046–1049.

by Rethore et al. [1970], more than 150 affected patients were reported in the literature [Guilherme et al., 2014]. The syndrome is clinically characterized by a wide range of signs, including mainly craniofacial and digital dysmorphic features, as well as a variable degree of intellectual disability [Bouhjar et al., 2011; Guilherme et al., 2014]. Indeed, the phenotypic variability seems to depend upon the size of the genomic imbalance presented by each patient [Wilson et al., 1985]. Phenotype–genotype correlation studies have suggested that there is a minimal critical region for the characteristic partial 9p

Conflicts of interest: The authors declare there is no conflict of interest that could be perceived as influencing the impartiality of the study reported.

Grant sponsor: Sao Paulo Research Foundation (FAPESP); Grant number: 2013/03236-5; Grant sponsor: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Grant numbers: 459845/2014-4, 304678/2012-0.

*Correspondence to:

Alexander A. L. Jorge, M.D., Ph.D., Faculdade de Medicina da USP (LIM-25), Av. Dr. Arnaldo, 455 5° andar sala 5340, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: alexj@usp.br; alexj@pq.cnpq.br

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 22 December 2015

DOI 10.1002/ajmg.a.37521

Programa de Pós Graduação em Oncologia

Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 251, 6º andar - sala 36

CEP 01246-000 São Paulo – SP

Fone: (11) 3893-2789/4347 e-mail: onco.pg@usp.br

Declaração

Declaro, para os devidos fins, que a aluna **Tatiane Katsue Furuya**, nº USP 5451649, foi suplente de representante discente com mandato de 06/05/2015 a 05/05/2016 e representante discente com mandato de 06/05/2016 a 05/05/2017 do Programa de Pós-Graduação em Oncologia/FMUSP.

São Paulo, 15 de dezembro de 2016.

Profa. Dra. **Luisa Lina Villa**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Oncologia

Prof. Dr. Roger Chammas
Vice-Coordenador
Programa de Pós-Graduação em Oncologia
Faculdade de Medicina da USP

Fundamentos de

Oncologia Molecular

Renata de Freitas Saito
Marlous Vinícius Gomes Lana
Ruan F. V. Medrano
Roger Chammas

Alterações Genéticas no Câncer

5

Giselly Encinas
Tatiane Katsue Furuya Mazzotti
Maria Aparecida Nagai

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial e de múltiplas etapas, na qual inúmeros fatores etiológicos (genéticos e ambientais) interagem de formas variadas ainda pouco conhecidas.

Acredita-se que 5-10% dos casos de câncer possuam herança genética e seu desenvolvimento associado a uma mutação germinativa, transmitida de geração em geração. Contudo, a maioria dos casos é esporádica, ou seja, seu desenvolvimento é decorrente de mutações somáticas no tecido, geralmente em oncogenes e genes supressores de tumor.

A descoberta de alterações genéticas associadas ao câncer tem possibilitado a identificação de alvos moleculares seletivos. Desta forma, o tratamento pode ser direcionado contra a alteração molecular específica.

Ao final deste capítulo espera-se que o leitor compreenda: (i) principais conceitos e definições das alterações genéticas; (ii) importância dos oncogenes e genes supressores de tumor no desenvolvimento do câncer; (iii) principais síndromes hereditárias e genes envolvidos no câncer esporádico; (iv) conhecimento de algumas técnicas utilizadas para a detecção de alterações genéticas; e (v) os avanços dos estudos de variações na sequência do DNA.

CONCEITOS E DEFINIÇÕES

O processo de tumorigênese é complexo e envolve múltiplas etapas. O processo de formação de tumor e metástase depende do acúmulo de alterações em dezenas ou até centenas de genes, que podem ser ativados ou inativados por mecanismos genéticos (mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, instabilidade genômica) e epigenéticos (metilação de DNA, acetilação de histonas, microRNAs), sendo os oncogenes e os genes supressores de tumor os principais grupos de genes envolvidos nesse processo. Estas alterações podem ser herdadas ou ocorrer em células somáticas.

DESTAQUES

- Oncogenes e genes supressores de tumor.
- Mutações germinativas e somáticas.
- Técnicas para a detecção de alterações genéticas.
- Avanços no estudo de variações na sequência de DNA.

Controle da Expressão Gênica e Suas Alterações no Câncer

7

Fabyane de Oliveira Teixeira Garcia
Tatiane Katsue Furuya Mazzotti
Fátima Solange Pasini

INTRODUÇÃO

Uma célula é capaz de controlar e regular a forma como a informação contida nos genes é usada para gerar um determinado produto funcional ou estrutural. De acordo com o dogma central da biologia molecular, acreditou-se por muito tempo que um gene, ou uma sequência específica de DNA, podia ser transcrito em uma molécula de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), que por sua vez era traduzido em uma única proteína. Atualmente, sabe-se que este processo não acontece somente desta maneira, de tal forma que uma região gênica é responsável por realizar a transcrição de diversas moléculas de RNA, codificantes em proteínas ou não, capazes de participar de diversos mecanismos regulatórios e de sinalização intracelular. Para todo esse conjunto de informações, damos o nome de expressão gênica.

Existem várias etapas que podem ser controladas e moduladas durante a expressão de um gene em diferentes tipos celulares e na maioria dos casos a transcrição do RNA é o ponto de controle chave. Uma maquinaria trabalha coordenadamente para permitir uma alteração dinâmica em resposta a diferentes estímulos celulares.

Para o desenvolvimento e a manutenção normal de um organismo é essencial que haja um controle preciso da expressão gênica. Alterações nestes processos podem levar a alterações da função gênica, podendo contribuir para o desenvolvimento e a progressão tumoral. A seguir, serão detalhados os principais mecanismos envolvidos no controle da transcrição gênica em humanos e as alterações observadas no câncer.

Ao final deste capítulo espera-se que o leitor compreenda: (i) os principais mecanismos da transcrição de um gene; (ii) os mecanismos epigenéticos envolvidos na transcrição gênica; (iii) como os microRNAs participam do controle transcricional; e (iv) a importância da transcrição gênica na carcinogênese.

DESTAQUES

- Alterações genéticas e epigenéticas podem levar à desregulação da expressão de produtos gênicos extremamente importantes, podendo afetar a homeostase tecidual e levar à carcinogênese.
- MicroRNAs controlam diversas funções biológicas como crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose. Dependendo do contexto eles podem exercer funções de supressores tumorais ou de oncogenes.

MEDICINA

USP

**INSTITUTO DO
CÂNCER
DO ESTADO DE
SÃO PAULO**
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

Certificado

Concedemos o III Prêmio Maria Mitzi Brentani a

Tatiane Katsue Furuya Mazzotti

por ter apresentado na forma de painel o trabalho intitulado "Association between polymorphisms of inflammatory response related-genes and their haplotypes with gastric cancer susceptibility, progression and prognosis" tendo como autores Mazzotti, T.K.; Jacob, C.E.; Tomitão, M.T.; Cordoba-Camacho, L.C.; Martinez, M.C.; Nonogaki, S.; Callegari, G.; Eluf-Neto, J.; Alves, V.A.; Zilberstein, B.; Cecconello, I.; Ribeiro-Junior, U.; Chammas, R., durante a VI Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), ocorrida em 28 de novembro de 2014.

Marlous Vinícius Gomes Lana

Marlous Vinícius Gomes Lana

Coordenador Discente da VI Jornada da Pós-graduação em Oncologia
Centro de Investigação Translacional em Oncologia

Roger Chammas

Prof. Dr. Roger Chammas

Coordenador Docente da VI Jornada da Pós-graduação em Oncologia
Centro de Investigação Translacional em Oncologia

FUNDAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA

MEDICINA
USP

SECRETARIA
DA SAÚDE

CADA VEZ MELHOR

Montreal, February 12, 2015

Subject: 2015 Perseverance - IRIC Award

Dear Tatiane Katsue Furuya Mazzotti,

We are delighted to confirm that you have been awarded a Perseverance - IRIC Scholarship by the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) of the Université de Montréal.

The scholarship is awarded to you after a rigorous two-step selection process. A first step for admission to the second edition of IRIC's International Summer School on "Cancer Systems Biology" in Sao Paulo, Brazil (January 19-24, 2015), organized jointly between IRIC, UdeM, ICESP and USP, was conducted by the organizers of the Summer School, Drs Maria Nagai and Roger Chammas at ICESP, and Dr Trang Hoang at IRIC. This first selection was based on the excellence of your academic record. A second selection step, conducted by an international committee of experts from IRIC, was based on your excellent performance during the Summer School.

This scholarship of 1500\$ will cover the training fees and the fees for the utilization of the IRIC core facilities during the course that you will follow at the Institute (750\$). It will also cover half of your housing cost (650\$, university residence) and the totality of the medical insurance fees (100\$) during your stay in Montreal from July 20 to July 31, 2015. Please take note that this scholarship will be entirely managed by the Institute.

On behalf of the entire IRIC community and the numerous donors who have provided funding for your scholarship, we congratulate you and wish you every success in your academic career.

MICHEL BOUVIER, PH.D., FCAHS

Chief Executive Officer, IRIC

MARTINE RAYMOND, PhD

Director of Academic Affairs, IRIC

About the *IRIC Perseverance Challenge Fund*

Established in 2010, the *IRIC Perseverance Challenge Fund* of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) of the Université de Montréal finance two merit scholarship programs aimed at recruiting and training the best young scientists from around the world in the field of cancer research.

The *IRIC Next Generation Internship Awards* are intended for undergraduate students who wish to do an internship at IRIC with the goal of pursuing graduate studies. The *Perseverance Awards* are for graduate students in systems biology alternating between theoretical learning and practical applications.

The *IRIC Perseverance Challenge Fund* is an initiative of Dr. Robert Patenaude, spokesman for IRIC and founder of the *IRIC Great Challenges Against Cancer*. IRIC wishes to express its gratitude to all participants and donors to the *IRIC Perseverance Challenge Fund*, and recognizes particularly the generosity of the *Fondation famille Gosselin*.

Montréal, December 16, 2015

Subject : Course Certificate

TO WHOM IT MAY CONCERN

We hereby confirm that Tatiane Katsue Furuya (matricule 20053432) was registered to the practical course BIM6065D – Functional Genomics, who took place at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, from July 20, 2015 to July 31, 2015. During this course of 60 hours, Tatiane had the opportunity to discover several core facilities and laboratories of the Institute.

Should you have any question, please do not hesitate to contact the IRIC Office of Academic Affairs.

Best regards,

Institute for Research in
Immunology and Cancer

PO Box 6128
Station Centre-ville
Montreal, Québec H3C 3J7
CANADA

Campus address :
Université de Montréal
Marcelle-Coutu Building
2950, Polytechnique Road

www.irc.ca

Martine Raymond, Ph.D.

Director of Academic Affairs
Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)
514.343.6111 ext 0542

MEDICINA

INSTITUTO DO
CÂNCER
DO ESTADO DE
SÃO PAULO
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

Certificado

Concedemos o V Prêmio Maria Mitzi Brentani a

Tatiane Katsue Furuya

por ter apresentado na forma de painel o trabalho de DOUTORADO intitulado Polymorphisms in inflammatory response related genes associated with susceptibility, progression and prognosis of gastric cancer, tendo como autores de Furuya TK; Jacob CE; Tomiño MTP; Cordoba-Camacho LC; Ramos MK; Eluf-Neto J; Alves VA; Zilberstein B; Ceconello I; Ribeiro-Junior U; Chammas, R., durante a VIII Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), ocorrida em 25 novembro de 2016.

Prof. Dra Luisa Lina Villa

Coordenadora Docente da VIII Jornada da Pós-graduação em Oncologia
Centro de Investigação Translacional em Oncologia

MEDICINA
USP

SECRETARIA
DA SAÚDE

Certificado

Concedido a

Tatiane Katsue Furuya

pela autoria do capítulo “Alterações genéticas no Câncer; Controle da Expressão Gênica e Suas Alterações no Câncer; Protocolos Teóricos Práticos em Biologia Molecular Aplicada a Câncer” do livro **FUNDAMENTOS DE ONCOLOGIA MOLECULAR**, lançado em 2015 pela Editora Atheneu, sob autoria de Renata de Freitas Saito, Marlous Vinícius Gomes Lana, Ruan Felipe Vieira Medrano e Roger Chammas, considerado como um dos **Destques do Ano de 2016** pelo Programa de Pós-Graduação

em Oncologia da FMUSP.

Prof. Dra Luisa Lina Villa

Coordenadora Docente da VIII Jornada da Pós-graduação em Oncologia

Certificado

Concedido a

Tatiane Katsue Furuya

por ter participado da Comissão Organizadora da VII Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), ocorrida em 04 dezembro de 2015.

Prof^a Dra. Luisa Lina Villa

Coordenadora Docente da VII Jornada da Pós-graduação em Oncologia
Centro de Investigação Translacional em Oncologia

Certificado

Concedido a

Tatiane Katsue Furuya

por ter participado da Comissão Organizadora da VIII Jornada da Pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) / Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), realizada em 25 de novembro de

2016.

Prof. Dra Luisa Lina Villa

Coordenadora Docente da VIII Jornada da Pós-graduação em Oncologia

Centro de Investigação Translacional em Oncologia