



**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE MINAS GERAIS**



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**VARIANTES GENÉTICAS NA REGIÃO PROMOTORA DA  
CICLOOXIGENASE 2 (COX2) E SUSCEPTIBILIDADE AO  
CÂNCER GÁSTRICO NO PERU**

**AUTORA: Roxana Zamudio Zea**

**ORIENTADOR: Prof. Eduardo Martín Tarazona Santos**

**BELO HORIZONTE**

**Fevereiro - 2011**

**Roxana Zamudio Zea**

**Variantes Genéticas na Região Promotora da  
Ciclooxigenase 2 (COX2) e Susceptibilidade ao  
Câncer Gástrico no Peru**

*Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Genética da  
Universidade Federal Minas Gerais,  
como pré-requisito para obtenção do  
grau de Mestre em Genética.*

**Orientador: Prof. Eduardo Martín Tarazona Santos**

**Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Belo Horizonte**

**Fevereiro – 2011**

*Dedico este trabalho de pesquisa, para a obtenção do grau de mestre, a minha querida família – meu pai, José, minha mãe, Maria, minha irmã, Gisela, meu irmãozinho, Zahir e meu sobrinho, Fabian – pela compreensão, apoio, conselhos, força, e acima de tudo pelo amor incondicional que sempre me dedicam.*

## AGRADECIMENTOS

Estendo meus sinceros agradecimentos:

Ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por me concederem a bolsa que permitiu a realização deste trabalho.

A meu orientador Prof. Eduardo M. Tarazona Santos, pela oportunidade de vir para o Brasil, por orientar-me no desenvolvimento deste trabalho e ter me permitido fazer parte do grupo de alunos do Laboratório de Diversidade Genética Humana (LDGH).

Ao Dr. Robert H. Gilman do *Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas* (LIEI) de Lima no Peru, pela contribuição fundamental na seleção e coleta das amostras de indivíduos com e sem câncer gástrico, e de indivíduos ameríndios, e também pela disponibilidade do seu laboratório para fazer as extrações de DNA.

A todos os colegas do LDGH pela receptividade, amabilidade, disponibilidade, ajuda e conversas. Agradeço a Marília pelo carinho, disponibilidade em ouvir e ajudar-me. Da mesma forma agradeço a Latife, por toda ajuda na revisão da dissertação, pelas sugestões, pelo trabalho compartilhado no Peru com as extrações de DNA. Com essas mesmas estimas também agradeço a Luciana W, Moara, Camila, Fernanda S, Maíra, Fernanda K, Wagner e Giordano, por terem me acolhido e ajudado muito em diferentes momentos, pela convivência no laboratório e acima de tudo pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de genética de Populações (GENEPOP), pela atenção, ajuda, conversas e os sorrisos.

Ao professor Fabrício Santos e a Daniela do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM) do ICB-UFMG pela disposição dos aparelhos para o sequenciamento e genotipagem, facilitando a realização deste trabalho. Ao José S. por ter essa disponibilidade em ajudar.

À secretaria da Pós-Graduação em genética, pela ajuda com a documentação nas matrículas e outros trâmites burocráticos.

Aos amigos dos diferentes laboratórios do ICB que me conhecem, obrigada pelos bons votos e momentos compartilhados.

Aos meus amigos do LIEI do Peru pelo carinho e amizade de sempre, e ao Dr. Holger Mayta por acreditar em mim, pela motivação, principalmente nos momentos complicados, e por me incentivar a ir sempre mais além...

Aos meus amigos que me ajudaram em diferentes situações. A Maria José por ser muito gentil comigo, pelo oráculo do pão, por ter me ajudado na extensão do visto de estudante, pelas conversas e sorrisos. Do mesmo jeito agradeço a Sandra P, Marcela C, Marina, Maité, Silvia B, Maria Elena, Priscila, Karem, Norma e Luana, pelo carinho e ajuda.

Aos meus pais por serem a razão da minha força, pelo incentivo, por respeitarem cada decisão minha, por sempre acreditarem em mim! ... obrigada por tudo. Aos meus irmãos (Gisela e Zahir) e sobrinho pela alegria que me transmitem, ao meu cunhado (Eric) pelas palavras de “aliento”. Agradeço também a meus tios pelos conselhos e carinho.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e na minha vivência aqui no Brasil. Obrigada!

# SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS.....  | VII  |
| LISTA DE TABELAS.....  | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | IX   |
| RESUMO.....  | 1    |
| ABSTRACT.....  | 2    |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 3    |
| 1.1. <i>O câncer gástrico</i> .....  | 3    |
| 1.2. <i>Fatores de risco para o câncer gástrico</i> .....  | 4    |
| 1.3. <i>Patologia do câncer gástrico</i> .....   | 7    |
| 1.4. <i>Ciclooxigenase 2</i> .....   | 8    |
| 1.5. <i>O gene COX2</i> .....  | 9    |
| 1.6. <i>Variantes genéticas da COX2</i> .....  | 10   |
| 1.7. <i>Estudos de associação com genes candidatos</i> .....   | 11   |
| 1.8. <i>Genotipagem com ensaios TaqMan</i> .....   | 12   |
| 2. OBJETIVOS.....  | 14   |
| 2.1. <i>Objetivo geral</i> .....   | 14   |
| 2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....  | 14   |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 15   |
| 3.1. <i>Amostras populacionais do estudo</i> .....   | 15   |
| 3.2. <i>Amostras de DNA</i> .....  | 16   |
| 3.3. <i>Sequenciamento e identificação de polimorfismos da região promotora de COX2 em ameríndios Quéchuas</i> ..... | 16   |
| 3.4. <i>Análise do padrão de diversidade genética da região promotora de COX2</i> .....                              | 18   |
| 3.5. <i>Identificação e seleção dos SNPs da região promotora do gene COX2 associados com o câncer gástrico</i> ..... | 19   |
| 3.6. <i>Genotipagem de indivíduos com e sem câncer gástrico, e indivíduos nativos americanos</i> .....               | 20   |

|  |    |
|--|----|
| 3.7. Análises estatísticas .....   | 21 |
| 4. RESULTADOS .....  | 22 |
| 4.1. Amostras de DNA .....   | 22 |
| 4.2. Análises dos polimorfismos na região promotora do gene COX2 em africanos, europeus e ameríndios .....                         | 22 |
| 4.3. TagSNPs associados com a susceptibilidade ao câncer gástrico selecionados para teste de associação na população peruana ..... | 27 |
| 4.4. Genotipagem de indivíduos casos e controles da população peruana miscigenada, e indivíduos da população ameríndia .....       | 28 |
| 4.5. Análises de associação entre as variantes genéticas e a susceptibilidade ao câncer gástrico .....                             | 29 |
| 5. DISCUSSÃO .....   | 31 |
| 6. CONCLUSÕES .....  | 36 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 37 |
| 8. ANEXOS .....  | 44 |
| ANEXO 1: protocolo de extração de DNA utilizando o Kit da Gentra .....   | 44 |
| ANEXO 2: protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio .....  | 46 |
| ANEXO 3: purificação dos produtos de PCR com polietilenoglicol (PEG) .....   | 47 |
| ANEXO 4: sequenciamento no ABI3130 .....   | 48 |
| ANEXO 5: precipitação da placa de sequenciamento ABI3130 .....   | 49 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Incidências de câncer gástrico no sexo masculino.....                       | 4  |
| <b>Figura 2</b> Incidências de câncer gástrico no sexo feminino.....                        | 4  |
| <b>Figura 3</b> Progressão da infecção por <i>H. pylori</i> ao adenocarcinoma gástrico..... | 8  |
| <b>Figura 4</b> Estrutura do gene <i>COX2</i> .....   | 10 |
| <b>Figura 5</b> Esquema da reação com o ensaio TaqMan .....                                 | 13 |
| <b>Figura 6</b> Representação dos genótipos para um SNP.....                                | 21 |
| <b>Figura 7</b> Padrão de desequilíbrio de ligação do gene <i>COX2</i> .....                | 25 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> Características dos <i>primers</i> para o gene <i>COX2</i> .....  | 17 |
| <b>Tabela 2</b> Componentes da reação de PCR em tempo real com ensaios TaqMan.....  | 20 |
| <b>Tabela 3</b> Frequências absolutas genotípicas dos 6 SNPs do gene <i>COX2</i> nas três populações parentais da população peruana. ....           | 23 |
| <b>Tabela 4</b> Frequência relativa alélica dos polimorfismos da região promotora do gene <i>COX2</i> nos europeus, africanos e ameríndios. ....    | 24 |
| <b>Tabela 5</b> Frequências absolutas dos haplótipos inferidos nos europeus, africanos e ameríndios Quéchuas.....                                   | 26 |
| <b>Tabela 6</b> Diversidade intra-populacional e testes de neutralidade nas populações africana, europeia e ameríndia para o gene <i>COX2</i> ..... | 27 |
| <b>Tabela 7</b> Diversidade inter-populacional ( <i>Pairwise</i> $F_{ST}$ ) para o gene <i>COX2</i> .....   | 27 |
| <b>Tabela 8</b> Frequências absolutas alélicas e genotípicas dos dois SNPs para as 5 amostras, e os valores de p para o HWE .....                   | 29 |
| <b>Tabela 9</b> Análise de associação para o polimorfismo rs689465 .....  | 30 |
| <b>Tabela 10</b> Análise de associação para o polimorfismo rs689466 .....   | 30 |
| <b>Tabela 11</b> Estudos de associação de polimorfismos da região promotora do gene <i>COX2</i> e o câncer gástrico em diferentes populações.....   | 33 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |   |
|--------|---|
| AG     | : adenocarcinoma gástrico   |
| AIMs   | : marcadores informativos de ancestralidade                       |
| CNPq   | : Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico   |
| COX2   | : Ciclooxygenase 2  |
| CGAS   | : estudos de associação com genes candidatos                      |
| DL     | : desequilíbrio de ligação  |
| GLU    | : <i>Genowide Library Utilites</i>                                |
| HWE    | : equilíbrio de Hardy-Weinberg                                    |
| IARC   | : Agência Internacional para Pesquisa em Câncer                   |
| INDEL  | : inserção/deleção  |
| LDGH   | : Laboratório de Diversidade Genética Humana                      |
| LIEI   | : <i>Laboratório de Investigación en Enfermedades Infecciosas</i> |
| MAF    | : <i>minor allele frequency</i>                                   |
| NCBI   | : <i>National Center for Biotechnology Information</i>            |
| OR     | : <i>Odd ratio</i>  |
| PCR    | : reação em cadeia da polimerase                                  |
| PEC-PG | : Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação                |
| PEG    | : Polietilenoglicol   |
| PTGS2  | : Prostaglandina endoperóxido sintase-2                           |
| SNP    | : polimorfismo de um nucleotídeo                                  |
| UPCH   | : <i>Universidad Peruana Cayetano Heredia</i>                     |
| OMS    | : Organização Mundial da Saúde                                    |

## RESUMO

A inflamação da mucosa gástrica é um fator importante no desenvolvimento de câncer gástrico, e acredita-se que a enzima Ciclooxygenase 2 (codificada pelo gene *COX2*) participa no processo inflamatório, contribuindo no reparo da lesão na mucosa gástrica. Assim, a expressão da *COX2* seria benéfica para a mucosa gástrica. Entretanto, vários estudos sugerem que a super-expressão da *COX2*, devido a polimorfismos, aumenta o risco de desenvolver câncer gástrico. Vários trabalhos realizados em outras populações demonstraram a associação entre SNPs da região promotora do gene *COX2* com o câncer gástrico. Por tal motivo, o objetivo deste trabalho foi testar se essas variantes genéticas estão associadas com o câncer gástrico na população peruana, ressaltando que o Peru é o país que apresenta as maiores taxas de incidência e mortalidade por esse tipo de câncer na América Latina. Para atingir esse objetivo, foi desenvolvida uma metodologia que permitiu obter os seguintes resultados: (1) foram identificados 6 SNPs na região promotora do gene *COX2* em indivíduos da população ameríndia; 3 dos quais também estão presentes nos europeus e africanos (rs20417, rs689465 e rs689466), e 3 são novas variantes; (2) foram estimados 10 haplótipos comuns, e a diversidade haplotípica e nucleotídica nos ameríndios foi maior do que os europeus e menor do que os africanos. O DL foi maior (87%) entre rs20417 e rs689465 nos europeus, que nos ameríndios (72%) e nos africanos (15%). De acordo com o valor do  $F_{ST}$  as três populações se diferenciam significativamente, e segundo os testes de neutralidade foi confirmada a hipótese nula de equilíbrio mutação deriva; (3) foram selecionados dois SNPs informativos rs689466 e rs689465, sendo este último um tagSNP; (4) foram determinados os genótipos e as frequências alélicas para os dois SNPs informativos em 225 pacientes com câncer gástrico e 352 controles da população peruana miscigenada para o teste de associação, e em indivíduos ameríndios de etnias diferentes (17 Quéchuas, 50 Shimaas e 52 Ashaninkas) para avaliar se essas frequências diferem da população miscigenada; (5) na análise de associação se obteve o  $OR=1,15$ ;  $IC^{95\%}$  0,85-1,57 para rs689465, e  $OR=0,93$ ;  $IC^{95\%}$  0,73-1,19 para a rs689466, estes resultados indicam que não há associação dessas variantes com o câncer gástrico. Este é o primeiro estudo que caracteriza as variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* em ameríndios do Peru, seu padrão de diversidade genética e testa a associação destas variantes com o câncer gástrico na população peruana miscigenada, não encontrando associação na população avaliada neste estudo.

**Palavras chave:** Ciclooxygenase 2, tagSNP, polimorfismos, câncer gástrico, associação.

## ABSTRACT

Inflammation of the gastric mucosa is an important factor in the development of gastric cancer, and it is believed that the enzyme cyclooxygenase 2 (encoded by the *COX2* gene) participates in the inflammatory process, helping to repair the lesion in the gastric mucosa. Thus, the expression of *COX2* would be beneficial to the gastric mucosa. However, several studies suggest that overexpression of *COX2* due to polymorphisms increases the risk of developing gastric cancer. Several studies conducted in other populations have demonstrated the association between SNPs in the promoter region of *COX2* gene with gastric cancer. For this reason, the objective of this work was to test whether these genetic variants are associated with gastric cancer in the Peruvian population, noting that Peru is the country with the highest rates of incidence and mortality of this cancer in Latin America. To achieve this goal, we developed a methodology that allowed us to obtain the following results: 1) 6 SNPs were identified in the promoter region of *COX2* gene in individuals of the indigenous population, 3 of which are also present in Europeans and Africans (rs20417, rs689465 and rs689466), and 3 are new variants, (2) 10 common haplotypes were estimated, and haplotype and nucleotide diversity in Amerindians was higher than that of Europeans and smaller than that of Africans. The DL was higher (87%) between rs20417 and rs689465 in Europeans, that Amerindians (72%) and Africans (15%). According to the value of the  $F_{ST}$ , all three populations differ significantly, and according to the neutrality tests it was confirmed the null hypothesis of mutation drift equilibrium, (3) we selected two informative SNPs rs689466 and rs689465, the latter one being a tagSNP, (4) genotypes were determined and the allele frequencies for the two informative SNPs, in 225 patients with gastric cancer and 352 controls from a mixed population of Peru for association test, and in Amerindians of different ethnicities (17 Quechuas, 50 Shimaas and 52 Ashaninkas) to evaluate whether these frequencies differ from the mixed population, (5) in association analysis was obtained OR=1.15; 95%CI:0.85-1.57 for rs689465, and OR=0.93; 95%CI:0.73-1.19 for rs689466, these results indicate that there is no association of these variants with gastric cancer. This is the first study that characterizes genetic variants of the promoter region of *COX2* gene in Peruvian Amerindians and its pattern of genetic diversity, and tests the association of these variants with gastric cancer in the admixture Peruvian population, finding no association in the population evaluated in this study.

**Key words:** cyclooxygenase 2, tagSNP, polymorphisms, gastric cancer, association.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O câncer gástrico

Denomina-se câncer ao grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais. Dentro dos tipos de câncer se encontra o câncer gástrico, do qual mais de 90% são representados por adenocarcinomas (de origem epitelial), e 10% por linfomas ou leiomiomas (tumores estromais malignos) (BRENNER *et al.*, 2009).

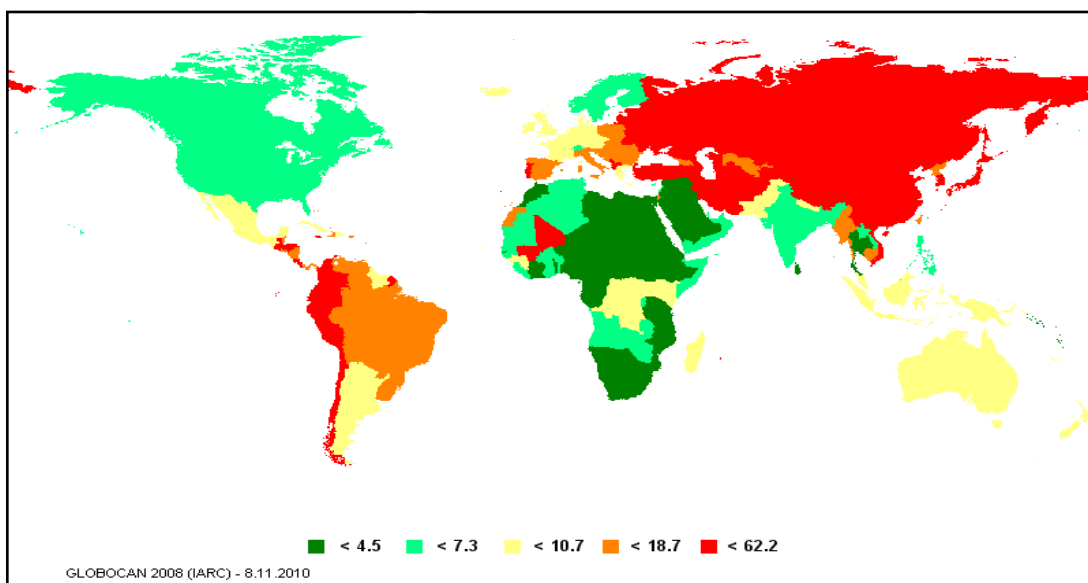
O câncer gástrico já foi o segundo tipo de câncer mais comum em todo mundo, porém, atualmente, são estimados 989 mil novos casos por ano no mundo, sendo essa incidência<sup>1</sup> inferior ao do câncer de pulmão, mama, cólon e reto. O câncer de estômago é a segunda causa mais comum de morte por câncer e é responsável por 700 mil mortes por ano no mundo (BRENNER *et al.*, 2009; FERLAY *et al.*, 2010).

A incidência de câncer gástrico tem uma ampla variação geográfica. As áreas de alto risco incluem Leste da Ásia, Leste da Europa e partes da América Central e do Sul; e as taxas de incidência são baixas na Ásia meridional, norte e Leste da África, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia (BRENNER *et al.*, 2009). Na Figura 1 observa-se as taxas de incidência no sexo masculino e na Figura 2 no sexo feminino, cujas taxas de incidência são menores; todas as taxas de incidências foram ajustadas pela idade (BOYLE; LEWIN, 2008).

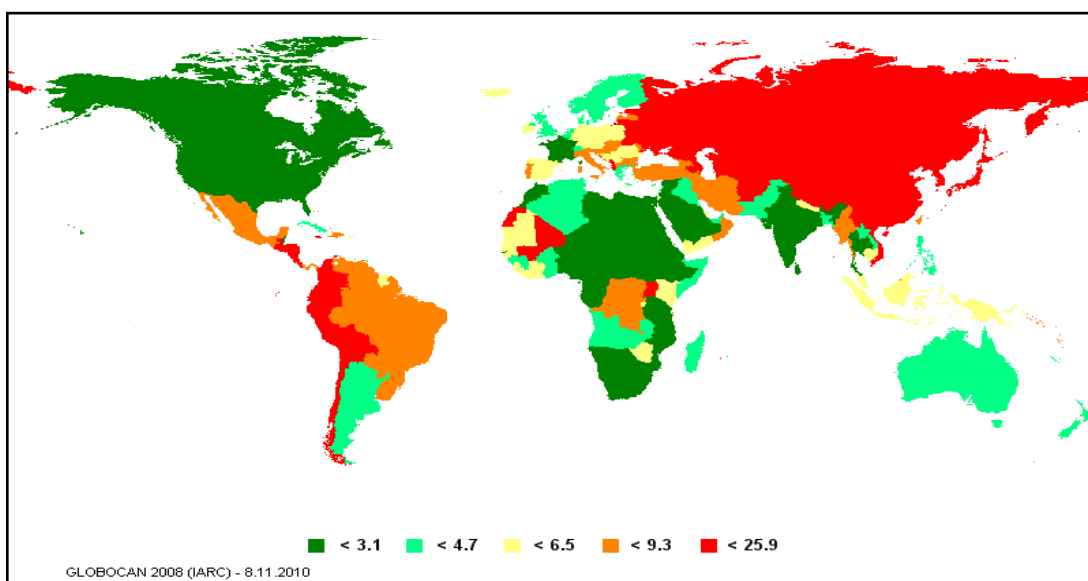
No Peru, o câncer gástrico é o segundo câncer mais frequente nos homens e o terceiro nas mulheres, sendo a primeira causa de mortalidade associada com o câncer em ambos os sexos. A taxa de incidência nos homens e nas mulheres é 22,6 e 20,0 por 100 mil habitantes, respectivamente, uma das mais altas no continente americano (FERLAY *et al.*, 2010). A alta taxa de incidência de câncer gástrico no Peru está, provavelmente, relacionada à alta prevalência de infecção por *Helicobacter pylori*: mais de 90% dos peruanos de condições socioeconômicas baixas, e cerca de 50% dos peruanos de nível socioeconômico médio alto são infectados; devido principalmente às condições sanitárias e hábitos alimentares (SOTO *et al.*, 2003).

---

<sup>1</sup> A incidência se define como o número de casos novos de câncer que se diagnostica cada ano em uma população de um tamanho determinado. Normalmente se expressam como o número total de casos por 100 mil habitantes por ano (BANDI *et al.*, 2011).



**Figura 1** Incidências de câncer gástrico no sexo masculino por 100.000 habitantes.  
 Fonte: (GLOBOCAN, 2008).



**Figura 2** Incidências de câncer gástrico no sexo feminino por 100.000 habitantes.  
 Fonte: (GLOBOCAN, 2008).

### ***1.2. Fatores de risco para o câncer gástrico***

Existem numerosos fatores de risco que se associam em maior ou menor grau com o câncer de estômago em diversas regiões do mundo.

### **1.2.1. Fatores dietéticos**

Evidências epidemiológicas em muitos estudos casos-controle sugerem associação da ingestão excessiva de sal, alimentos em conserva, comida defumada e baixo consumo de vegetais verdes e frutas cítricas, com um alto risco de desenvolver o câncer gástrico (GOMEZ *et al.*, 2009). As evidências têm mostrado que o consumo elevado de sal produz dano sobre a mucosa gástrica e que as frutas frescas e vegetais têm um efeito protetor pela ação de vitaminas com propriedades antioxidantes (por exemplo: vitamina C, beta-caroteno, vitamina E e micronutrientes-selênio) (BOYLE; LEWIN, 2008). O desenvolvimento do câncer gástrico também está associado com a concentração de nitritos na dieta e na água de consumo. As bactérias presentes na boca e estômago reduzem os nitritos a nitratos que podem dar lugar à formação de nitrosamidas e nitrosaminas, de efeito mutagênico e oncogênico conhecido. Outros fatores ambientais como o consumo de álcool e tabaco não estão bem relacionados com o desenvolvimento de câncer gástrico (GOMEZ *et al.*, 2009).

### **1.2.2. Infecção por *Helicobacter pylori***

*H. pylori* é uma bactéria gram negativa que coloniza o estômago. Esta é uma das infecções mais comuns nos seres humanos, com uma prevalência estimada de 50% no mundo todo e 90% em países em desenvolvimento (BOYLE; LEWIN, 2008). Em 1994 um grupo de trabalho da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a *H. pylori* como carcinógeno para o ser humano do grupo I, esta categoria é usada quando existe evidência suficiente de que o agente é cancerígeno para humanos (RAMÍREZ; SÁNCHEZ, 2008; SIERRA *et al.*, 2008).

Nas populações com altas taxas de incidência de infecção por *H. pylori*, como as de Leste da Ásia, têm alta incidência da doença de câncer gástrico, entretanto populações da África e Sul da Ásia não apresentam altas taxas de incidência dessa doença. A diferença nas taxas de incidência de câncer gástrico é associada com áreas geográficas diferentes, isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelas diferenças nos genótipos dos genes *cagA* e *vacA*, os quais são genes de patogenicidade de *H. pylori*, em diferentes áreas geográficas (YAMAOKA *et al.*, 2008). A *H. pylori* é geneticamente muito variável e há evidências de que as diferentes linhagens genéticas desta bactéria diferem na sua patogenicidade (BOYLE; LEWIN, 2008).

Clinicamente, a infecção com a cepa de *H. pylori cagA* positivo foi associada com altos níveis de inflamação da mucosa gástrica, assim como severas gastrites atróficas e sugere-se que tem um papel importante no desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (KUIPERS *et al.*, 1995; KIKUCHI *et al.*, 1999). Mais de 90% das cepas de *H. pylori* em Lima-Peru são *cagA* positivos, o que está relacionado a um aumento no risco de desenvolver inflamação crônica e câncer gástrico (RAMÍREZ; SÁNCHEZ, 2008). Estudos realizados na Tailândia e Japão demonstraram que o *cagA* do Leste asiático é mais virulento que o *cagA* Ocidental em relação aos resultados clínicos (AZUMA *et al.*, 2004; VILAICHONE *et al.*, 2004).

### **1.2.3. Fatores geográficos e étnicos**

Existe uma alta incidência de câncer gástrico nas populações não europeias nos Estados Unidos. Essa alta incidência é encontrada nas populações de nativos americanos (21,6/100.000) e asiáticos (20/100.000). Tanto a etnia quanto o sexo têm influência no risco de desenvolvimento do câncer gástrico. Foi observado que a maior taxa de mortalidade, com base na combinação de sexo e etnia, é no sexo masculino afro-americano (12,4/100.000) (JEMAL *et al.*, 2009). A incidência de carcinoma gástrico também varia pela localização geográfica. Um estudo realizado pela Sociedade Americana de Câncer sugere que os pacientes japoneses que vivem nos Estados Unidos que desenvolvem câncer gástrico podem ter diferenças na fisiopatologia em comparação com os pacientes de origem europeia (REZNEK, 2010)

### **1.2.4. Fatores genéticos do indivíduo que afetam a susceptibilidade ao câncer gástrico**

Os fatores genéticos dos indivíduos também são determinantes para o aumento da susceptibilidade para muitos tipos de câncer. A variabilidade genética do indivíduo interfere tanto no risco de desenvolver adenocarcinoma gástrico quanto na variação inter-individual da progressão da doença (PEREZ-PEREZ *et al.*, 2005). Os tumores gástricos podem ser caracterizados por uma sequência de eventos genéticos que caracteriza todas as etapas do desenvolvimento da doença (TEDESCHI, 2006).

Variantes da citocina pró-inflamatória *IL1 $\beta$*  têm sido associadas com câncer gástrico em europeus, asiáticos e mexicanos (PEREZ-PEREZ *et al.*, 2005; GARZA-GONZALES *et al.*, 2005). Outras citocinas envolvidas no perfil pró-inflamatório são *TNF- $\alpha$* , *IL10* e *IL8*. Savage *et al.*, (2004) encontraram associação entre um haplótipo de *IL8* e



adenocarcinoma da cárdia gástrica na população chinesa (RR=4.14). Variantes de *IL8* também têm sido associadas com úlceras duodenais induzidas por *H. pylori* na Europa (GYULAI *et al.*, 2004), e com alta soropositividade de anti-corpos anti *H. pylori* no Japão juntamente com uma variante de IL-10. Assim, variantes genéticas em *TLR2*, *COX2*, *IL8*, *IL8RA*, *IL8RB*, e *IL1 $\beta$* , componentes da resposta imune contra a infecção por *H. pylori*, estão associados à susceptibilidade ao adenocarcinoma gástrico.

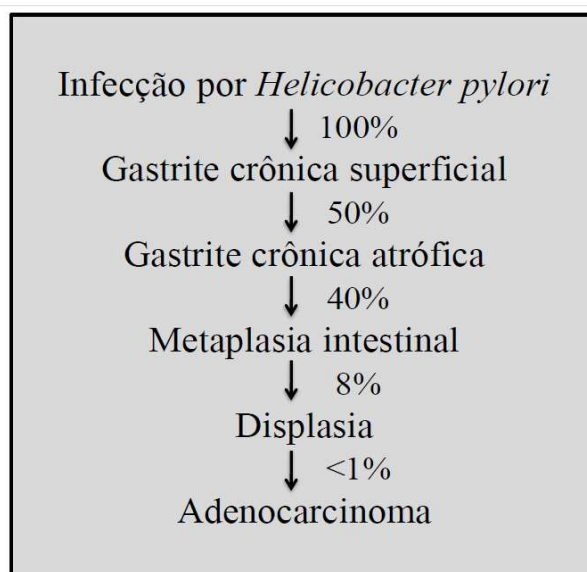
### **1.3. Patologia do câncer gástrico**

O desenvolvimento do câncer gástrico é um processo multifatorial, complexo e de evolução longa. A infecção por *H. pylori* associada com fatores dietéticos, ambientais e genéticos, favorecidos pelo baixo nível socioeconômico, iniciam a transformação de uma mucosa normal em gastrite crônica superficial, nas etapas sucessivas a gastrite crônica atrófica e em uma porcentagem progressivamente decrescente de pacientes ocorre a evolução para metaplasia intestinal, displasia e finalmente ao adenocarcinoma gástrico (GOMEZ *et al.*, 2009).

Correa (1992), baseando-se em observações histopatológicas, propôs um modelo de progressão para o desenvolvimento do câncer gástrico de tipo intestinal (Figura 3), que é coerente tanto com os efeitos da resposta imune pró-inflamatória contra *H. pylori* quanto com o surgimento de mutações somáticas em células epiteliais do estômago que podem resultar em câncer. O modelo de Correa considera as etapas já mencionadas no parágrafo anterior.

Em 1965, Láuren classificou os tumores gástricos em dois tipos, intestinal e difuso, de acordo com suas características morfológicas, bioquímicas e epidemiológicas. O carcinoma tipo intestinal é o principal tipo de tumor encontrado em populações de alto risco, está presente mais nos homens que em mulheres, com uma incidência de 2:1, e a faixa etária em torno dos 60 anos. É um adenocarcinoma com diversos graus de diferenciação, cujas células são grandes e claramente definidas, pleomórficas, com núcleos hipercromáticos, apresentando frequentemente Figuras de mitose invadindo a parede gástrica, formando predominantemente massas distintas e definidas. O carcinoma difuso ocorre mais frequentemente na idade de 45 a 50 anos, com uma incidência semelhante em homens e mulheres. Essa neoplasia tem um padrão celular mais homogêneo, com núcleos

monomórficos e regulares, sem formar glândulas, e as células neoplásicas isoladas infiltram a parede difusamente.



**Figura 3** Progressão da infecção por *H. pylori* ao adenocarcinoma gástrico e porcentagem de indivíduos em cada estágio que desenvolve o estágio sucessivo. Fonte: CORREA *et al.*, 1992.

#### 1.4. Ciclooxygenase 2

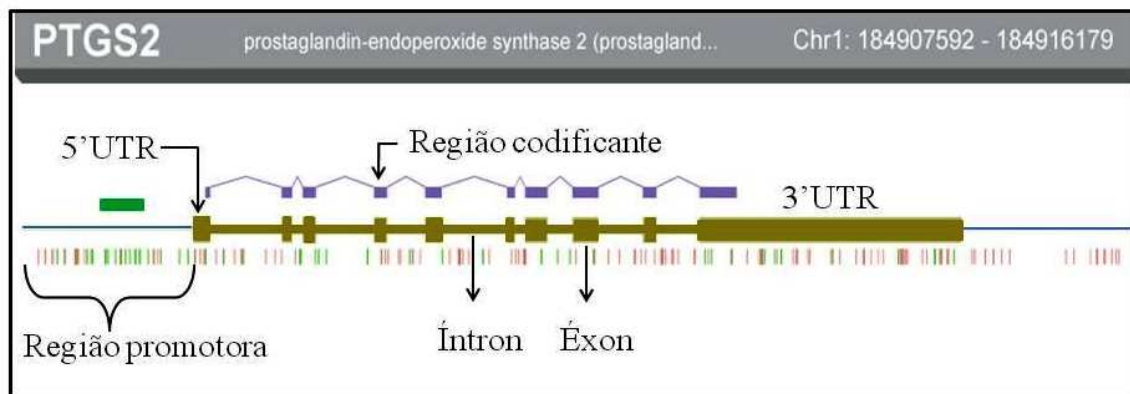
A inflamação é um importante fator para o desenvolvimento de muitos tipos de câncer. Acredita-se que as prostaglandinas (PGs) cumprem um papel importante na inflamação, na proliferação celular e na angiogênese, que são fatores relevantes para desenvolver câncer e sua progressão. A Ciclooxygenase 2 (*COX2*) conhecida também como Prostaglandina endoperóxido sintase 2 (codificada pelo gene *PTGS2*) é uma enzima pró-inflamatória que converte ácido araquidônico em prostaglandina (CERELLA *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2010).

A *COX2* é uma das enzimas da família *COX*, sendo a *COX1* e *COX3* as outras duas enzimas. A *COX1* é expressa constitutivamente em baixos níveis em muitos tecidos, o que contribui para a manutenção de importantes funções fisiológicas, tais como agregação das plaquetas, balanço hídrico renal e proteção da mucosa gástrica. As funções da *COX3* ainda precisam ser melhor definidas, mas sua expressão parece ser específica em alguns compartimentos incluindo cérebro e medula espinhal (CERELLA *et al.*, 2010).

Em contraste, a *COX2* é raramente expressada em tecidos normais, mas é rapidamente induzida por processos inflamatórios, fatores de crescimento, citocinas, carcinógenos e patógenos (WANG *et al.*, 2005). Na inflamação gástrica, a *COX2* estimula a proliferação celular e a inibição da apoptose no epitélio gastrointestinal, mecanismos estes que contribuiriam para reparar a lesão produzida na mucosa. Portanto, embora a expressão de *COX2* seja benéfica para a mucosa gástrica, a sua super-expressão teria consequências perniciosas (GISBERT; PAJARES, 2003). A super-expressão de *COX2* pode levar ao aumento da proliferação celular, inibição da apoptose, processos estes importantes no desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico, e facilitar a invasão de células cancerosas (CAO; PRESCOTT, 2002). A elevada expressão de *COX2* foi observada em câncer colorretal, câncer pulmonar, câncer gástrico, carcinoma de células escamosas de esôfago e câncer de mama (DAVIS *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2010).

### **1.5. O gene *COX2***

O gene codificante, *PTGS2* ou *COX2* está localizado no cromossomo 1 (locus q25.2-q25.3) e possui aproximadamente 12500 pares de bases (pb) que incluem a região promotora, 5'UTR, 10 éxons, 9 íntrons e 3'UTR (número de acesso no *GenBank* AY382629). A estrutura deste gene foi caracterizada por Appleby *et al.* (1994). Na região promotora existem várias sequências de consenso (ou sequências *cis*, reguladoras da transcrição no promotor do gene) para os seguintes fatores *trans* (fatores, quase sempre proteínas, que interagem com as sequências *cis*): três para o SP1 (proteína específica 1), duas para o NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), duas para AP-2 (ativação da proteína 2), uma para Ets-1 (sequência de transformação específica 1) (APPLEBY *et al.*, 1994; KOSAKA *et al.*, 1994). Estes elementos *cis* e *trans* participam na regulação da expressão do gene. Na Figura 4 encontra-se representada a estrutura do gene *COX2*.



**Figura 4** Estrutura do gene *COX2*. Fonte: <http://genewindow.nci.nih.gov>

### 1.6. Variantes genéticas da *COX2*

O polimorfismo de base única (SNP) é a forma mais comum das variações genéticas do genoma humano, com uma frequência maior do que 1%, e pode contribuir à susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças (CHECA, 2007).

Vários SNPs foram identificados no gene *COX2* (HALUSHKA *et al.*, 1999; COX *et al.*, 2001), no entanto, poucos têm sido estudados em relação à alteração da função ou a expressão da *COX2* (LIN *et al.*, 2002). No estudo de PAPAFILE *et al.*, (2002) foi descrito um polimorfismo na região promotora de *COX2* – rs20417 – caracterizado pela substituição de guanina (G) por citosina (C). Esse polimorfismo parece interromper o sítio de ligação do fator da transcrição Sp1, o qual é considerado um ativador da transcrição, o que leva a uma redução de 30% da atividade do promotor *in vitro* (PAPAFILE *et al.*, 2002). Entretanto, outro estudo sugeriu que a transcrição do gene *COX2* é ativado pelo fator E2F1 (*E2 promoter binding factor 1*), portanto, o SNP rs20417 criaria um sítio de ligação para E2F1, essencial para a expressão de vários genes, o que pode ser a razão para o aumento do risco de câncer (SZCZEKLIK *et al.*, 2004).

Portanto, de acordo com os estudos já mencionados, as variantes genéticas (SNPs) da região promotora de *COX2* podem ter um maior impacto na transcrição do gene devido à alteração da capacidade de ligação dos fatores de transcrição nas sequências *cis*, resultando na variabilidade inter-individual à susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer (LIU *et al.*, 2010).

Várias iniciativas para catalogar variantes genéticas no genoma humano têm sido desenvolvidas durante os últimos anos, orientadas tanto para genes importantes nos cânceres (*SNP500Cancer*, PACKER *et al.*, 2006) como para doenças cardiovasculares e imunidade

(*SeattleSNPs* e *Innate-Immunity*, LIVINGSTON *et al.*, 2004) ou para todo o genoma humano (*HapMap*, The International HapMap Consortium 2005).

O projeto *SeattleSNPs* tem uma abordagem no sequenciamento completo de genes (região promotora, 5'UTR, éxon, íntron e 3'UTR) envolvidos nos processos inflamatórios, que permite a descoberta de novos polimorfismos. Atualmente, o *SeattleSNPs* inclui dados de 323 genes, e as informações das variantes genéticas desses genes são de domínio público. Porém, no contexto do estudo das populações da América Latina, o *SeattleSNPs* apresenta unicamente dados de duas populações parentais: europeus e africanos, mas não de nativos americanos. Para a região promotora do gene *COX2* estão disponíveis dados de 15 polimorfismos: rs4648250 (A>G), rs689462 (A>C), rs11567814 (*indel*-GT), rs689465 (A>G), rs689466 (A>G), rs3918304 (A>G), rs20415 (G>A), rs11567815 (C>G), rs20417 (G>C), rs4648256 (T>C), rs20418 (*indel*-TAG), rs20419 (T>C), rs5270 (C>G), e rs20424 (C>G).

### ***1.7. Estudos de associação com genes candidatos***

Estudos de epidemiologia genética com desenho caso-controle buscam caracterizar variantes genômicas que estão associadas com a susceptibilidade a doenças multifatoriais. Para detectar essas variantes podem ser utilizados os estudos de associação com genes candidatos (CGAS), neste estudo é testada a hipótese nula em que a frequência de uma variante gênica (alelo, haplótipo ou genótipo) não difere entre casos e controles de uma mesma população.

Embora os estudos de epidemiologia genética com desenho caso-controle sejam realizados há muito tempo, o conhecimento mais profundo do padrão de variabilidade genética presente nas populações humanas evidencia características importantes a serem consideradas nesse tipo de estudo. As características como o padrão de desequilíbrio de ligação ao longo do genoma humano e o nível de diferença nas frequências alélicas entre populações humanas devem ser consideradas no desenho, desenvolvimento e interpretação dos dados de estudos de epidemiologia genética.

CGAS é uma ferramenta clássica para inferir relações entre genes e doenças, podendo também validar relatos prévios de associações genéticas em diferentes populações. CGAS é um método com base em uma hipótese prévia de que genes específicos estão associados com o risco da doença. Nesses estudos, parte-se de um ou mais genes candidatos escolhidos pelo

pesquisador e busca-se uma associação estatística entre polimorfismos nesse gene e a doença (JORGENSEN *et al.*, 2009; TABOR *et al.*, 2002). Em outras palavras, pode-se perguntar se um determinado gene está ou não associado ao distúrbio em questão.

O poder estatístico de encontrar uma associação em CGAS pode aumentar quando, na escolha dos SNPs, são considerados o conhecimento das vias bioquímicas e os achados epidemiológicos anteriores. Quando é feita a escolha por um SNP aparentemente funcional (por exemplo, não-sinônimo ou em sítio de *splicing*) a associação com a doença só poderá ser confirmada após uma análise de desequilíbrio de ligação (DL) com outros SNPs, pois mesmo causando alterações na atividade da proteína, esse SNP pode ser apenas um marcador para outro SNP (JORGENSEN *et al.*, 2009).

### **1.8. Genotipagem com ensaios TaqMan**

O desenho de estudo caso-controle envolve a genotipagem dos SNPs em um grupo de indivíduos com a doença (casos) e indivíduos sem a doença (controles), no qual a frequência da variante genética em casos e controles é comparada. (PHAROAH *et al.*, 2004). Vários métodos para a genotipagem dos SNPs foram desenvolvidos, sendo um deles os ensaios TaqMan (KIM; MISRA, 2007).

O método de genotipagem com ensaios TaqMan apresenta propriedades tais como: o ensaio é efetuado em um formato de tubo fechado, sem as etapas de processamento pós-PCR, assim se reduz o risco de contaminação cruzada; tolera a variabilidade na qualidade e quantidade de DNA; é um método sensível e específico; os resultados são obtidos de forma simples e direta através da medição da fluorescência da reação (LIVAK, 2003; SEEB *et al.*, 2009).

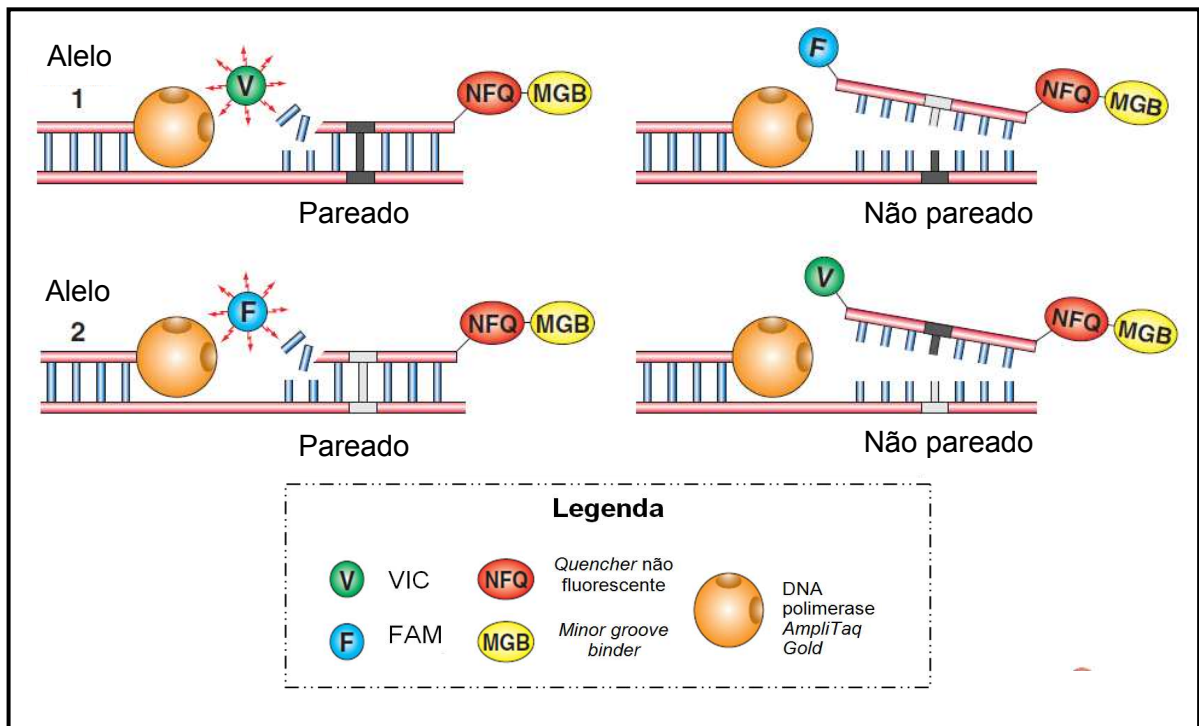
A genotipagem com ensaios TaqMan é também chamada de ensaio de discriminação alélica, e requer *primers forward* e *reverse* (para a amplificação da sequência de interesse), e duas sondas TaqMan MGB (para a detecção de alelos), cada sonda contém:

- Um corante fluorescente repórter VIC® (vermelho) na extremidade 5' da sonda do alelo 1, e FAM™ (azul) na extremidade 5' da sonda do alelo 2
- Um *Minor Groove Binder* (MGB) na extremidade 3' de cada sonda. Essa molécula permite elevar a temperatura de anelamento da sonda sem aumentar o seu comprimento, permitindo uma discriminação mais precisa dos alelos

- Um *quencher* não fluorescente (NFQ) na extremidade 3' de cada sonda. Esta molécula suprime a fluorescência emitida pelo repórter, sempre e quando estas duas moléculas se encontrem próximas.

Os eventos que ocorrem na PCR estão detalhados abaixo e na Figura 5:

- Cada sonda se anela especificamente à sequência complementar, entre as regiões dos *primers forward e reverse*. Quando a sonda está intacta, a proximidade do corante repórter com o NFQ resulta em supressão da fluorescência.
- A clivagem da sonda na extremidade 3' pela DNA polimerase *AmpliTaq Gold*® separa o corante repórter do NFQ, o que resulta na fluorescência do corante repórter. Sendo que, a *AmpliTaq Gold* cliva unicamente as sondas que estão hibridizadas.
- O sinal de fluorescência ocorre somente se a sequência alvo for complementar à sonda. Então o sinal gerado pela PCR indica que o alelo está presente na amostra.
- A clivagem da sonda separa o corante repórter do *quencher* (NFQ), resultando em um aumento da fluorescência pelo repórter. Assim, o sinal de fluorescência gerado pela amplificação da reação de PCR indica que alelos estão presentes na amostra de DNA.



**Figura 5** Esquema da reação com o ensaio TaqMan

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1. Objetivo geral***

Avaliar a associação entre variantes genéticas da região promotora do gene candidato *COX2* e o risco de desenvolvimento de câncer gástrico na população do Peru.

### ***2.2. Objetivos específicos***

- 2.2.1. Gerar dados de sequenciamento e identificar os polimorfismos da região promotora do gene *COX2* de ameríndios Quéchuas do Peru.
- 2.2.2. Analisar o padrão de diversidade genética da região promotora do gene *COX2* em africanos, europeus e ameríndios Quéchuas
- 2.2.3. Identificar e selecionar tag-SNPs, da região promotora do gene *COX2*, associado com a susceptibilidade para desenvolver o câncer gástrico.
- 2.2.4. Determinar os genótipos de indivíduos com e sem câncer gástrico da população peruana miscigenada e de indivíduos ameríndios (Asháninkas, Shimaas e Quéchuas)
- 2.2.5. Avaliar se as variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* estão associadas com o risco de desenvolver câncer gástrico na população miscigenada do Peru.



## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Amostras populacionais do estudo

Neste trabalho foram estudadas amostras de três populações parentais presentes na formação da população peruana: africanos, europeus e nativos americanos. Os dados dos 24 africanos e 23 europeus foram obtidos do banco de dados público *SeattleSNPs*. Os dados dos 24 nativos americanos – que pertencem à etnia Quéchuas – foram gerados neste estudo a partir do sequenciamento automático.

Para as amostras da população peruana miscigenada (pacientes com câncer gástrico e sem câncer gástrico) e da população ameríndia (indivíduos Asháninkas, Shimaas e Quéchuas), os dados foram gerados a partir de genotipagem com ensaios TaqMan.

As amostras de DNA foram extraídas de sangue periférico. Essas amostras foram coletadas pelo grupo de trabalho do nosso colaborador Dr. Robert Gilman do *Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI)* da *Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)* de Lima no Peru.

Na população peruana ameríndia, os Quéchuas pertencem ao departamento de Huancavelica; os Asháninkas, ao departamento de Junín; e os Shimaas, ao departamento de Cusco, sendo que, todos estes departamentos estão localizados nos Andes centrais do Peru. Na população peruana miscigenada, os indivíduos casos e controles são provenientes dos serviços de Gastroenterologia de três hospitais de Lima: *Hospital Nacional Arzobispo Loayza*, *Hospital Nacional Dos de Mayo* e *Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas*, e foram coletados no período de 2004 a 2009.

O protocolo de coleta de amostras em Lima utilizado pelo grupo do Dr. Robert Gilman, seguiu os seguintes critérios: adultos de ambos os sexos, com idade entre 35 e 75 anos, com sintomas dispépticos, ou qualquer paciente que se deseje submeter a um *screening* gratuito para câncer gástrico. Foi realizada uma endoscopia e a biópsia da mucosa gástrica foi coletada, assim como uma amostra de 10mL de sangue para extração do DNA. Os casos foram identificados por meio das análises patológicas das biópsias e confirmação de Adenocarcinoma gástrico. Depois de ter identificado um caso, a equipe do estudo identificou um controle do mesmo grupo etário (+/- 5 anos) e do mesmo sexo e hospital que o caso. Nas amostras de ameríndios também foram coletadas 10mL de sangue periférico para a extração de DNA. O protocolo de coleta foi aprovado pelo Comitê de Ética de todas as Instituições envolvidas no estudo.

### **3.2. Amostras de DNA**

As amostras de DNA de ameríndios Asháninkas e Shimaas foram extraídas a partir de sangue total periférico de acordo com o protocolo, padronizado e adaptado pelo Laboratório de Diversidade Genética Humana, do kit *Gentra® Puregene® Blood Kit (Qiagen)* (Anexo 1). No caso da amostra de sangue periférico dos casos e controles, várias delas apresentavam coágulos sanguíneos o que dificultou a extração com o kit comercial já mencionado anteriormente, então, para essas amostras foi empregado o método de extração Fenol-Clorofórmio (Anexo 2). As amostras de DNA de Quéchuas foram extraídas e quantificadas pelo grupo de trabalho de nosso colaborador Dr. Robert H. Gilman.

As amostras de DNA obtidas foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo scientific*) e armazenadas a -20°C até sua utilização.

As atividades de organização, preparação e extração das amostras foram compartilhadas com a doutoranda Latife Pereira, do Laboratório de Diversidade Genética Humana (LDGH), e foram realizadas no período de dezembro de 2009 a fevereiro de 2010 no Laboratório do Dr. Robert H. Gilman da *Universidad Peruana Cayetano Heredia* (UPCH).

### **3.3. Sequenciamento e identificação de polimorfismos da região promotora de COX2 em ameríndios Quéchuas**

#### **3.3.1. Amplificação e sequenciamento de DNA**

As amostras de DNA foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em um volume de 20µL. Essa reação foi realizada: em *buffer* de PCR da *Invitrogen* a uma concentração de 1X; em 1,5 mM de Cloreto de Magnésio; 200µM de dNTP; 0,3µM de *primer*; 0.3U de *Taq platinum* e 10 ng/uL de DNA.

Na Tabela 1 estão detalhados os cinco pares de *primers* (*forward* e *reverse*) utilizados na amplificação da região promotora do gene *COX2* (1911 pb). O ultimo *primer* PTGS2-Ex1 amplifica a parte final da região promotora (110 pb), toda a região 5'UTR (134 pb), todo o éxon 1 (52 pb) e parte do íntron 1 (137 pb). Todos os *primers* se sobrepõem em media 80 pb, possuem uma cauda universal M13 e foram desenhados no programa *primer3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

O programa de amplificação consistiu de uma fase inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos (94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento ( $T_a$ ) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) e com uma fase final de 72°C por 10 minutos.

**Tabela 1** Características dos *primers* para o gene *COX2*

| <i>Nome do Primer</i> | <i>Sequência dos primers (5' a 3')</i>                               | <i>Tamanho do produto (pb)</i> | <i>T<sub>a</sub></i> |
|-----------------------|--|--------------------------------|----------------------|
| PTGS2-4               | <i>f</i> : CTAGAGGAGGAGAAAGGCTTC<br><i>r</i> : CAGGGACGCTAAATGTCCAA  | 685                            | 64° C                |
| PTGS2-8               | <i>f</i> : GTGGACAGAAAAGACAAAAGA<br><i>r</i> : ATGTTTTAGTGACGACGCTTA | 493                            | 56° C                |
| PTGS2-11              | <i>f</i> : AGAAACAAGGAGGGGGTG<br><i>r</i> : GCTTCCGAGAGCCAGTTC       | 430                            | 56° C                |
| PTGS2-1               | <i>f</i> : AGGAAGCCAAGTGTCTT<br><i>r</i> : TGACAATTGGTCGCTAACC       | 409                            | 55° C                |
| PTGS2-Ex1             | <i>f</i> : GAGGAGGGAAAAATTTGTGG<br><i>r</i> : CAAGCTCTTTCCCAAGTCAC   | 433                            | 54° C                |

Os produtos amplificados foram submetidos à análise eletroforéticas em gel de agarose a uma concentração de 1%, com adição de 0,005% de Brometo de Etídeo, a 100 Volts por 50 minutos em Tampão TAE (Tris-acetato 4mM, EDTA 1mM, pH 7.7). Após a eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados no gel com luz ultravioleta (UV). O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA *ladder* de 100pb (*Invitrogen Corporation*, CA, USA). Posteriormente, os produtos amplificados foram purificados e precipitados de acordo com o método Polietilenoglicol (PEG), descrito no Anexo 3. Em seguida, foi realizado o sequenciamento bi-direcional (Anexo 4) utilizando-se *primers* universais M13 *forward* e *reverse* (*f*: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' e *r*: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'), os quais são complementares às caudas dos *primers* utilizados na PCR. Logo depois, foi realizada a purificação e precipitação da reação de sequenciamento (Anexo 5), e a eletroforese capilar no sequenciador automático ABI3130 da *Applied Biosystems*.

### 3.3.2. Identificação de variantes genéticas na região promotora de *COX2*

As análises das sequências que permitem identificar os polimorfismos foram feitas utilizando o pipeline de sequenciamento desenvolvido pelo nosso grupo (MACHADO *et al.*, 2011) e disponível no site (<http://www.cebio.org/pipelinedgh/>). Foram utilizados os

softwares *Phred-Phrap-Consed* e *Polyphred* distribuídos gratuitamente para fins acadêmicos. No software *Phred-phrap* (EWING; GREEN, P, 1998; EWING *et al.*, 1998; LEE; VEGA, 2004); o *Phred* lê as fluorescências dos arquivos gerados pelo seqüenciador, nomeia as bases (*base-calling*) e atribui um valor de qualidade a cada uma delas. O software *phrap* roda junto com o *Phred* e é responsável pelo alinhamento das sequências e formação de grupos (*contigs*); o programa *Polyphred* (NICKERSON *et al.*, 1997), compara as fluorescências obtidas de cada indivíduo para identificar locais heterozigotos para SNPs. Os SNPs são marcados com uma cor azul para a inspeção rápida e um arquivo de texto contendo todos os possíveis polimorfismos identificados é produzido em uma pasta (*edit\_dir*). Entretanto, o *PolyPhred* não é 100% específico e sensível, sendo que ele pode não identificar alguns SNPs, ou assinalar um falso SNP. Por isso, a inspeção visual dos fluorogramas é importante. E finalmente o *Consed* (GORDON *et al.*, 1998), é uma ferramenta para a visualização e edição das sequências produzidas, permitindo uma avaliação manual dos *contigs*.

Na análise dos dados, cada um dos picos dos fluorogramas é avaliado e comparado com uma seqüência referência, sendo que se houver alterações para serem feitas, estas serão realizadas no arquivo texto gerado pelo *PolyPhred*.

### ***3.4. Análise do padrão de diversidade genética da região promotora de COX2***

Primeiramente, os arquivos contendo os genótipos para os polimorfismos da região promotora do gene candidato *COX2* foram obtidos do banco de dados público *SeattleSNPs* (disponível no site <http://pga.gs.washington.edu/>) para as populações parentais: africana e européia, esses arquivos foram adquiridos em formato *prettybase* (*ptgs2.prettybase.txt*). No caso da população parental ameríndia, os dados foram adquiridos do arquivo de saída gerado pelo *Polyphred*.

A partir desses arquivos, foi gerado o arquivo de entrada para o programa PHASE versão 2.1 (STEPHENS, M *et al.*, 2001; STEPHENS, MATTHEW; SCHEET, 2005) através do pipeline de sequenciamento (disponível no site <http://www.cebio.org/pipelineldgh/>).

Com base nas frequências dos genótipos dos indivíduos o programa PHASE versão 2.1 inferiu os haplótipos, os quais representam a combinação mais provável dos alelos para diferentes SNPs em um mesmo cromossomo, assim para cada indivíduo são inferidos dois

haplótipos. A partir do arquivo de saída (*output file*) do PHASE, foi gerado o arquivo de entrada (*input file*) para o programa HAPLOVIEW versão 4.2 (BARRETT *et al.*, 2005), o qual estimou, utilizando a estatística  $r^2$  (coeficiente de correlação), o desequilíbrio de ligação dos SNPs da região promotora de *COX2* da população africana, europeia e ameríndia.

Logo depois, utilizando o software *DNAsp* versão 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foram estimadas as diversidades intra-populacional e inter-populacional e foi testada a hipótese de neutralidade.

Para estimar a diversidade intra-populacional foram calculados dois estimadores do parâmetro populacional de diversidade  $\theta$  ( $\pi$  e  $\theta_w$ ) e o índice de diversidade haplotípica (HD).  $\pi$  é a heterozigosidade média para todos os sítios analisados (TAJIMA, 1983),  $\theta_w$  é baseado no número de sítios segregantes (WATTERSON, 1975) e HD estima a probabilidade de que dois haplótipos amostrados por acaso da população, sejam diferentes (NEI, 1987).

A diversidade inter-populacional foi estimada pelo  $F_{ST}$  assumindo o modelo de substituição de Tamura & Nei (1993), o  $F_{ST}$  é uma medida de diferenciação entre populações.

O teste do equilíbrio mutação-deriva (que inclui a hipótese de neutralidade evolutiva) foi realizado a partir da análise das frequências dos SNPs. O afastamento das frequências observadas em relação às esperadas sob equilíbrio mutação-deriva foi estimado pelas estatísticas D de Tajima (TAJIMA, 1989) e D e F de Fu e Li (FU; LI, 1993), cujos valores esperados são zero quando há confirmação da hipótese nula de equilíbrio mutação-deriva. Valores próximos a zero são indicativos de neutralidade; valores negativos são indicativos de excesso de variantes raras que pode ser causado por seleção positiva ou purificadora e/ou expansão populacional e valores positivos são indicativos de excesso de variantes comuns que pode ser gerado por seleção balanceadora e/ou efeito gargalo recente.

### ***3.5. Identificação e seleção dos SNPs da região promotora do gene COX2 associados com o câncer gástrico***

Para a identificação e seleção de SNPs ou tagSNPs da região promotora do gene *COX2* associados com a susceptibilidade ao câncer gástrico foram feitas revisões na literatura publicada no período de 2006 a 2009. Para essa seleção de SNPs foram consideradas as seguintes características: valor do *Odd ratio* (OR) maior ou igual a 1,2 e a

frequência do alelo menor (MAF) maior do que 5%. Estes critérios, junto com a informação do padrão de DL das populações parentais dos peruanos, permitiram selecionar SNPs informativos e tag-SNPs. Esses dados foram utilizados para adquirir ensaios TaqMan® da *Applied Biosystems* para dois SNPs.

### **3.6. Genotipagem de indivíduos com e sem câncer gástrico, e indivíduos nativos americanos**

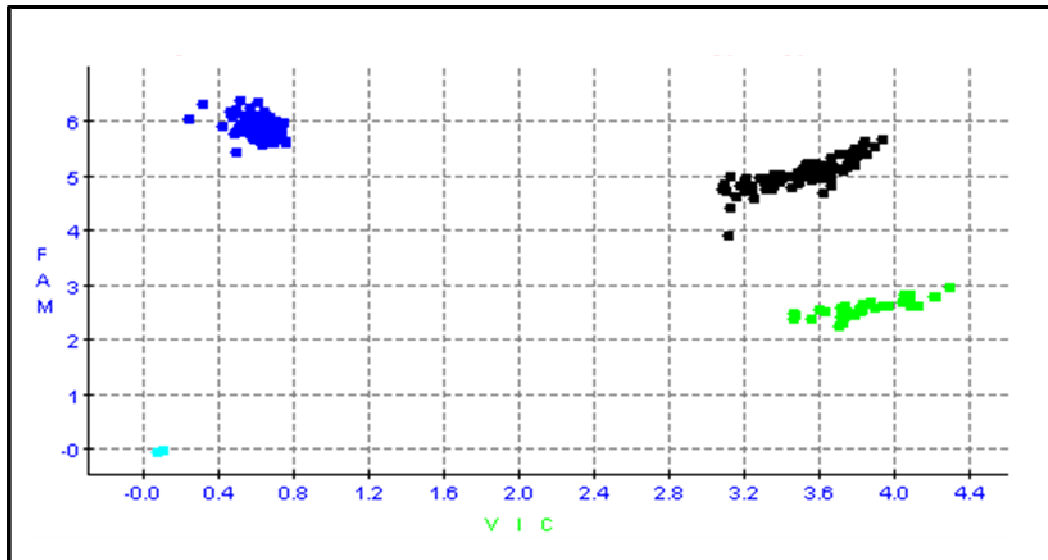
A genotipagem de dois SNPs (rs689465 e rs689466) foi realizada utilizando-se os ensaios TaqMan® da *Applied Biosystems* (a identificação dos ensaios estão disponíveis no site <http://snp.appliedbiosystems.com>). Para a genotipagem foi empregada a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real time-PCR*).

No procedimento o DNA e o mix da reação foram distribuídos em placas de 384 poços, sendo 6 desses poços controles negativos. Os componentes e seus volumes estão detalhados na Tabela 2. Em seguida as placas foram seladas com um adesivo óptico, e logo depois, a corrida da genotipagem foi realizada no ABI *Prism 7900HT* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular do ICB-UFMG.

**Tabela 2** Componentes da reação de PCR em tempo real com ensaios TaqMan

| <b>Componentes</b>                 | <b>µL por poço</b> |
|------------------------------------|--------------------|
| <i>Master mix</i> de PCR universal | 2,50               |
| TaqMan [2X]                        | 0,25               |
| Sondas TaqMan [20X]                | 2,25               |
| DNA [10ng/µL]                      | 5,00               |
| Volume final (µL)                  |                    |

Os genótipos dos indivíduos foram analisados e *plotados* utilizando-se o software *AutoCaller*<sup>TM</sup> versão 1.1 da *Applied Biosystems* como representado na Figura 6.



**Figura 6** Representação dos genótipos para um SNP. Em verde estão representados os homozigotos para o alelo1; em preto, os heterozigotos; em azul escuro, os homozigotos para o alelo2; e em azul claro, os controles.

Os dados dos genótipos em formato SDAT (tabela com as informações dos indivíduos nas linhas e os genótipos nas colunas) foram utilizados para calcular as frequências alélicas e genóticas através do software GLU versão 1.0a6 (*Genowide Library Utilites*, disponível no site <http://code.google.com/p/glu-genetics>).

### 3.7. *Análises estatísticas*

O controle de qualidade dos dados dos genótipos obtidos do sequenciamento e da genotipagem são parâmetros importantes que foram examinados. Para esse fim, foi utilizado o Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para testar as hipóteses do modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (BALDING, 2006) utilizando-se o software GLU versão 1.0a6.

Para o estudo caso-controle, a análise de associação entre os SNPs da região promotora do gene *COX2* e a susceptibilidade ao câncer gástrico, foi feita utilizando o software PLINK versão 0.99 (PURCELL *et al.*, 2007), foi estimado o valor do *Odd ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (CI<sup>95%</sup>) e o valor de p do teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) a um nível de significância de 5%.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Amostras de DNA**

Foram obtidas no total 799 amostras de DNA, as quais foram extraídas a partir de sangue periférico total e coágulo utilizando os métodos de precipitação de proteínas. Destas, 697 pertencem ao grupo de casos-controles (352 controles, 225 casos e 120 sem diagnóstico histopatológico) e 102 ameríndios (52 Asháninkas, 50 Shimaas). Todas essas amostras foram utilizadas na genotipagem.

Também foram obtidas 44 amostras de DNA de ameríndios Quéchuas (24 deles utilizados no sequenciamento e 17 na genotipagem), os quais foram fornecidos pelo grupo de trabalho do Dr. Robert H Gilman.

O rendimento das extrações variou de 0,8 µg a 217,28 µg por amostra, sendo que 88% dessas amostras continham mais de 2 µg de DNA.

### **4.2. Análises dos polimorfismos na região promotora do gene COX2 em africanos, europeus e ameríndios**

Foram sequenciadas e analisadas a região promotora do gene COX2 (1911pb) para cada um dos 24 ameríndios Quéchuas. Foram identificados 6 SNPs na região promotora dos quais, sendo que 3 destes são novos SNPs encontrados neste estudo e estão nomeados pela sua posição no cromossomo.

As frequências absolutas dos genótipos para os 6 SNPs estão listadas na Tabela 3. Todas as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para todos os polimorfismos.



**Tabela 3** Frequências absolutas genóticas dos 6 SNPs do gene *COX2* nas três populações parentais da população peruana.

| <i>Posição na seq. ref.</i> | <i>SNP</i>   | <i>Genótipos</i> | <i>Africanos</i> | <i>Europeus</i> | <i>Ameríndios</i> |
|-----------------------------|--------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| 517                         | Chr184917655 | TT               | 24               | 23              | 22                |
|                             |              | TC               | 0                | 0               | 1                 |
|                             |              | CC               | 0                | 0               | 0                 |
| 703                         | rs689465     | AA               | 17               | 15              | 16                |
|                             |              | AG               | 4                | 7               | 7                 |
|                             |              | GG               | 2                | 1               | 0                 |
| 727                         | Chr184917445 | CC               | 24               | 23              | 22                |
|                             |              | CG               | 0                | 0               | 1                 |
|                             |              | GG               | 0                | 0               | 0                 |
| 798                         | rs689466     | AA               | 19               | 17              | 5                 |
|                             |              | AG               | 4                | 6               | 15                |
|                             |              | GG               | 0                | 0               | 3                 |
| 1228                        | rs20417      | GG               | 11               | 12              | 16                |
|                             |              | GC               | 12               | 8               | 7                 |
|                             |              | CC               | 1                | 1               | 0                 |
| 1998                        | Chr184916177 | AA               | 24               | 23              | 22                |
|                             |              | AG               | 0                | 0               | 1                 |
|                             |              | GG               | 0                | 0               | 0                 |

Através do banco de dados público *SeattleSNPs*, foram obtidos os dados dos polimorfismos da região promotora do gene *COX2* para 23 europeus e 24 africanos. Na Tabela 4 se apresentam as frequências do alelo menor (MAF) de todos os polimorfismos (SNPs e *indels*) da região promotora do gene *COX2* nos africanos, europeus e ameríndios, e se destacam em vermelho a MAF maior do que 5% dos SNPs comuns nas três populações (\*).

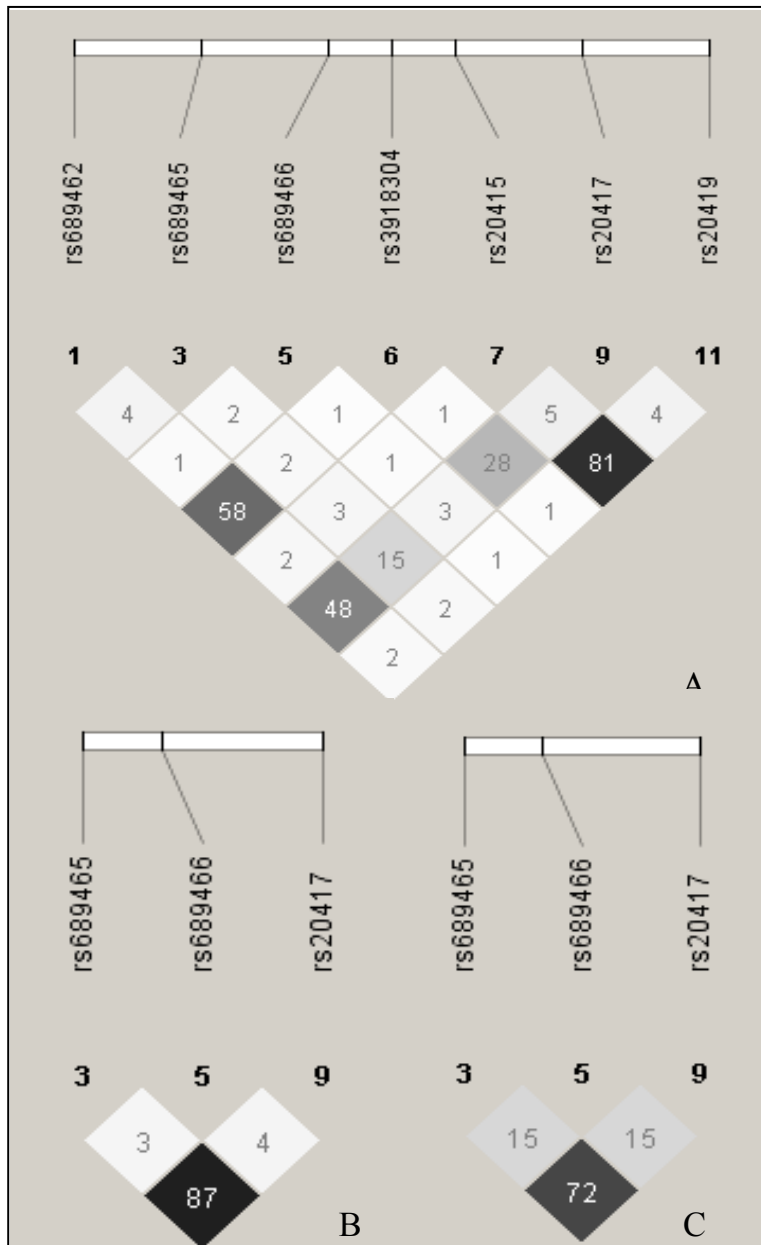
**Tabela 4** Frequência relativa alélica dos polimorfismos da região promotora do gene *COX2* nos europeus, africanos e ameríndios.

| <i>Posição na seq. ref.</i> | <i>ID polimorfismos</i> | <i>Alelos</i> | <i>MAF</i>       |                 |                   |
|-----------------------------|-------------------------|---------------|------------------|-----------------|-------------------|
|                             |                         |               | <i>Africanos</i> | <i>Europeus</i> | <i>Ameríndios</i> |
| 466 <sup>ab</sup>           | rs689462                | A>C           | 0,17             | 0,02            | 0,00              |
| 517 <sup>c</sup>            | Chr184917655            | T>C           | 0,00             | 0,00            | 0,02              |
| 663 <sup>+</sup>            | rs57968198              | GT>_          | 0,17             | 0,02            | 0,00              |
| 703 <sup>abc</sup>          | <u>rs689465*</u>        | A>G           | <b>0,17</b>      | <b>0,20</b>     | <b>0,15</b>       |
| 727 <sup>c</sup>            | Chr184917445            | C>G           | 0,00             | 0,00            | 0,02              |
| 798 <sup>abc</sup>          | <u>rs689466*</u>        | A>G           | <b>0,09</b>      | <b>0,13</b>     | <b>0,46</b>       |
| 842 <sup>a</sup>            | rs3918304               | A>G           | 0,11             | 0,00            | 0,00              |
| 861 <sup>a</sup>            | rs20415                 | G>A           | 0,13             | 0,00            | 0,00              |
| 1115 <sup>a</sup>           | rs11567815              | C>G           | 0,02             | 0,00            | 0,00              |
| 1228 <sup>abc</sup>         | <u>rs20417*</u>         | G>C           | <b>0,29</b>      | <b>0,24</b>     | <b>0,15</b>       |
| 1279 <sup>a</sup>           | rs4648256               | T>C           | 0,02             | 0,00            | 0,00              |
| 1339 <sup>+</sup>           | rs20418                 | _>TAG         | 0,06             | 0,00            | 0,00              |
| 1389 <sup>a</sup>           | rs20419                 | T>C           | 0,10             | 0,00            | 0,00              |
| 1833 <sup>a</sup>           | rs5270                  | C>G           | 0,04             | 0,00            | 0,00              |
| 1934 <sup>b</sup>           | rs20424                 | C>G           | 0,00             | 0,05            | 0,00              |
| 1998 <sup>c</sup>           | Chr184916177            | A>G           | 0,00             | 0,00            | 0,02              |
| 2067 <sup>a</sup>           | rs11567819              | C>T           | 0,03             | 0,00            | 0,00              |

<sup>a</sup> SNPs nos africanos; <sup>b</sup> SNPs nos europeus; <sup>c</sup> SNPs nos ameríndios; <sup>+</sup> *indels*

\* SNPs comuns nas três populações (**MAF>5%**)

Os *indels* apresentados na Tabela 4 foram excluídos das análises de genética de populações. Os padrões de desequilíbrio de ligação (DL) dos SNPs da região promotora para o gene *COX2*, nos africanos, europeus e ameríndios, estão representados na Figura 7. Para as análises de DL foram consideradas apenas os SNPs comuns (MAF>0,05), assim no padrão de DL nos africanos são observados 7 SNPs; no entanto nos europeus e ameríndios apenas 3 SNPs. Observa-se também que, o DL encontrado entre os SNPs rs689465 e rs20417 foi maior nos europeus (87%), um pouco menor nos ameríndios (72%), e bem inferior nos africanos (15%).



**Figura 7** Padrão de desequilíbrio de ligação do gene *COX2*. (A) africanos (B) europeus (C) ameríndios. As cores e os números nos quadrados indicam a correlação entre os SNPs, em que os valores podem variar de 0 a 100%.

Utilizando-se o programa PHASE foram feitas as inferências de haplótipos nas três populações. Na Tabela 5 estão detalhados os haplótipos dos SNPs que apresentaram  $MAF > 0,05$  em pelo menos uma população. Observa-se que o haplótipo 3 é o mesmo que a sequência de referência, a qual se encontra disponível no NCBI com o número de acesso AY382629.1. Esse haplótipo foi o mais frequente nas 3 populações, embora nos ameríndios

ela seja menor quando comparado com os africanos e europeus. O haplótipo 6 é mais comum nos ameríndios que nas outras populações e o haplótipo 8 se encontra nas três populações com muito pouca diferença entre eles.

**Tabela 5** Frequências absolutas dos haplótipos inferidos nos europeus, africanos e ameríndios quéchuas.

| <i>Chr1</i>         | rs689462            | rs689465 | rs689466 | rs3918304 | rs20415 | rs20417 | rs20419 | rs20424 | <i>Europeus</i> | <i>Africanos</i> | <i>Ameríndios</i> | <b><i>TOTAL</i></b> |
|---------------------|---------------------|----------|----------|-----------|---------|---------|---------|---------|-----------------|------------------|-------------------|---------------------|
| <i>Seq. ref.</i>    | A                   | A        | A        | A         | G       | G       | T       | C       |                 |                  |                   |                     |
| <i>Haplótipo 1</i>  | .                   | .        | .        | .         | A       | .       | C       | .       | 0               | 5                | 0                 | <b>5</b>            |
| <i>Haplótipo 2</i>  | .                   | .        | .        | .         | A       | .       | .       | .       | 0               | 1                | 0                 | <b>1</b>            |
| <i>Haplótipo 3</i>  | .                   | .        | .        | .         | .       | .       | .       | .       | 28              | 21               | 18                | <b>67</b>           |
| <i>Haplótipo 4</i>  | .                   | .        | .        | .         | .       | .       | .       | G       | 2               | 0                | 0                 | <b>2</b>            |
| <i>Haplótipo 5</i>  | .                   | .        | .        | .         | .       | C       | .       | .       | 0               | 0                | 1                 | <b>1</b>            |
| <i>Haplótipo 6</i>  | .                   | .        | G        | .         | .       | .       | .       | .       | 6               | 4                | 21                | <b>31</b>           |
| <i>Haplótipo 7</i>  | .                   | G        | .        | .         | .       | .       | .       | .       | 0               | 3                | 1                 | <b>4</b>            |
| <i>Haplótipo 8</i>  | .                   | G        | .        | .         | .       | C       | .       | .       | 9               | 6                | 7                 | <b>22</b>           |
| <i>Haplótipo 9</i>  | C                   | .        | .        | .         | .       | C       | .       | .       | 1               | 3                | 0                 | <b>4</b>            |
| <i>Haplótipo 10</i> | C                   | .        | .        | G         | .       | C       | .       | .       | 0               | 5                | 0                 | <b>5</b>            |
|                     | <b><i>TOTAL</i></b> |          |          |           |         |         |         |         | <b>46</b>       | <b>48</b>        | <b>48</b>         | <b>142</b>          |

A partir dos dados de resequenciamento, foi estimada a diversidade dentro das populações africana, europeia e ameríndia para o gene *COX2*, essas informações se encontram detalhadas na Tabela 6. Observa-se que a amostra de africanos é mais polimórfica, possuindo um maior número de sítios segregantes e *singletons* que a dos europeus e ameríndios. Logo, os africanos apresentam os maiores valores das estimativas da diversidade haplotípica e nucleotídica ( $\pi$  e  $\theta_w$ ). Os europeus apresentam os menores valores, e os ameríndios apresentam valores intermediários. Por outro lado, os testes de neutralidade não foram significativos ( $p > 0,10$ ), confirmando a hipótese nula de equilíbrio mutação-deriva.

**Tabela 6** Diversidade intra-populacional e testes de neutralidade nas populações africana, europeia e ameríndia para o gene *COX2*. Para cada indivíduo foram sequenciados 1911pb.

|   | <i>Africanos</i>  | <i>Europeus</i>   | <i>Ameríndios</i> |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Número de cromossomos</i>                          | 48                | 46                | 48                |
| <i>Sítios segregantes/ Singletons</i>                 | 11/3              | 5/1               | 6/3               |
| <i>Estrutura haplotípica</i>                          |                   |                   |                   |
| Número de haplótipos inferidos                        | 11                | 5                 | 7                 |
| Diversidade haplotípica $\pm$ desvio padrão           | 0,809 $\pm$ 0,046 | 0,585 $\pm$ 0,068 | 0,694 $\pm$ 0,038 |
| Parâmetro de recombinação ( $\rho$ ) <sup>†</sup>     | 0,000949416       | 0,0161178         | 0,00588294        |
| <i>Estimadores da diversidade <math>\theta</math></i> |                   |                   |                   |
| Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )                    | 0,00104           | 0,00054           | 0,00063           |
| $\theta_w$  | 0,00130           | 0,00060           | 0,00071           |
| <i>Testes de neutralidade*</i>                        |                   |                   |                   |
| D de Tajima   | -0,58526          | -0,23357          | -0,29799          |
| D de Fu & Li  | -0,26661          | 0,15473           | -1,38132          |
| F de Fu & Li  | -0,43810          | 0,04052           | -1,21943          |

<sup>†</sup> O parâmetro de recombinação foi estimado com o software PHASE versão 2.1.

\* Significância dos testes de neutralidade,  $p > 0,10$

Os valores de divergência entre as populações ( $F_{ST}$ ) mostraram que existe diferença significativa entre as populações parentais (Tabela 7).

**Tabela 7** Diversidade inter-populacional (*Pairwise*  $F_{ST}$ ) para o gene *COX2*

|                  | <i>Europeus</i> | <i>Ameríndios</i> |
|------------------|-----------------|-------------------|
| <i>Africanos</i> | 0,02535**       | 0,10061***        |
| <i>Europeus</i>  |                 | 0,06530**         |

\*\*  $0.001 < p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  para estatística de Hudson 2000

#### 4.3. *TagSNPs* associados com a susceptibilidade ao câncer gástrico selecionados para teste de associação na população peruana

Foram publicados nove estudos no período 2006-2009 em diferentes populações da Ásia e Europa que testaram a associação entre variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* e a susceptibilidade para desenvolver o adenocarcinoma gástrico, seis desses

estudos demonstraram a associação entre os SNPs (rs20417, rs689465 e rs689466) e a doença. Esses três SNPs foram candidatos para ser estudados neste trabalho. As variantes rs20417 e rs689466 se destacam devido a suas características: replicação da associação em vários estudos anteriores, nos quais o OR foi maior do que 1,2, e a MAF>5%. Além disso, essas duas variantes têm ensaios TaqMan padronizados na empresa *Applied Biosystems*, entretanto para a variante rs20417 não existe ensaio TaqMan padronizado nessa empresa.

Para a seleção de SNPs informativos, foi adotada uma estratégia, a seleção de um tagSNP. De acordo com a análise do padrão de desequilíbrio de ligação (já representado na Figura 8) os polimorfismos rs20417 e rs689465 estão em desequilíbrio de ligação, tanto na população europeia como na ameríndia, selecionando-se assim o rs689564 como TagSNP, o qual fornece informação do estado alélico do rs20417.

Assim, foram selecionadas duas variantes genéticas – rs689465 e rs689566 – da região promotora do gene *COX2* para a genotipagem de indivíduos com e sem câncer gástrico (para testar a associação com a susceptibilidade para desenvolver a doença) e indivíduos ameríndios (para saber a frequência dessas variantes na população parental do Peru).

#### ***4.4. Genotipagem de indivíduos casos e controles da população peruana miscigenada, e indivíduos da população ameríndia***

Os resultados da genotipagem dos 225 indivíduos com câncer gástrico (casos), 352 sem câncer gástrico (controles) e nativos americanos (52 Ashaninkas, 50 Shimaas e 17 Quéchuas) foram analisados no programa *AutoCaller* versão 1.1.

Posteriormente, foi utilizado o software GLU para calcular as frequências genotípicas e alélicas, e para testar a hipótese do modelo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para os dois SNPs; esses resultados estão expostos na Tabela 8.

**Tabela 8** Frequências absolutas alélicas e genotípicas dos dois SNPs para as 5 amostras, e os valores de p para o HWE

| <i>rs689465 A&gt;G</i> |                              |          |            |                                 |           |           |           |
|------------------------|------------------------------|----------|------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Amostras</i>        | <i>Freq. Abs. dos Alelos</i> |          | <i>MAF</i> | <i>Freq. Abs. dos Genótipos</i> |           |           | <i>p*</i> |
|                        | <b>A</b>                     | <b>G</b> |            | <b>AA</b>                       | <b>AG</b> | <b>GG</b> |           |
| Casos                  | 366                          | 84       | 0,187      | 147                             | 72        | 6         | 0,515     |
| Controles              | 587                          | 117      | 0,166      | 244                             | 99        | 9         | 1,000     |
| Ashaninkas             | 96                           | 8        | 0,077      | 44                              | 8         | 0         | 1,000     |
| Shimaas                | 81                           | 19       | 0,190      | 35                              | 11        | 4         | 0,055     |
| Quéchuas               | 24                           | 10       | 0,294      | 9                               | 6         | 2         | 0,573     |

| <i>rs689466 A&gt;G</i> |                              |          |                    |                                 |           |           |           |
|------------------------|------------------------------|----------|--------------------|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Amostras</i>        | <i>Freq. Abs. dos Alelos</i> |          | <i>MAF</i>         | <i>Freq. Abs. dos Genótipos</i> |           |           | <i>p*</i> |
|                        | <b>A</b>                     | <b>G</b> |                    | <b>AA</b>                       | <b>AG</b> | <b>GG</b> |           |
| Casos                  | 277                          | 173      | 0,384              | 107                             | 85        | 33        | 1,000     |
| Controles              | 422                          | 282      | 0,401              | 170                             | 126       | 56        | 1,000     |
| Ashaninkas             | 45                           | 59       | 0,567 <sup>a</sup> | 9                               | 27        | 16        | 0,782     |
| Shimaas                | 61                           | 39       | 0,390              | 20                              | 21        | 9         | 0,388     |
| Quéchuas               | 25                           | 9        | 0,265              | 8                               | 9         | 0         | 0,276     |

Em todas as amostras o alelo G corresponde ao alelo menor (MAF)

<sup>a</sup> O valor é maior nos Ashaninkas

\*Valor significativo para o  $p < 0,05$  para o teste de  $\chi^2$  do modelo de HWE

Nota-se que, no rs689465 os valores das MAFs mais discrepantes encontram-se nos Ashaninkas e Quéchuas quando comparados com as frequências nos casos, controles e Shimaas, sendo o menor valor (7,7%) encontrado nos Ashaninkas e o maior valor (29,4%) nos Quéchuas. Para o polimorfismo rs689466 as frequências das MAFs são homogêneas nos casos, controles, Shimaas e Qhuéchuas, entretanto, nos Ashaninkas essa frequência encontra-se maior. Todas as amostras desse estudo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#### **4.5. Análises de associação entre as variantes genéticas e a susceptibilidade ao câncer gástrico**

Para avaliar a hipótese de associação das variantes genéticas com o câncer gástrico na população peruana, foram empregados o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o *Odd ratio* (OR).

Para as análises foi assumido o modelo aditivo, que supõe que cada cópia de G modifica o risco em uma quantidade aditiva, por tanto os homocigotos GG têm o dobro do risco dos heterocigotos AG. Observam-se nas Tabelas 9 e 10 as frequências absolutas dos genótipos e as frequências relativas dos alelos para as variantes rs689465 e rs689466, respectivamente. Para as duas variantes genéticas os testes de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) não foram significativos ao nível de significância de 5% e os valores do OR não foram significativos, embora na variante rs689465 o valor da unidade se encontra no extremo do intervalo de confiança, mas não é suficiente a favor da hipótese de associação.

**Tabela 9** Análise de associação para o polimorfismo rs689465

|                           | <i>Trend</i>                               |    |    | <i>Allelic</i>                     |        |
|---------------------------|--|----|----|------------------------------------|--------|
|                           | AA   | AG | GG | A                                  | G      |
| <b>Casos</b>              | 147  | 72 | 6  | 0,8130                             | 0,1867 |
| <b>Controles</b>          | 244  | 99 | 9  | 0,8338                             | 0,1662 |
| <b>Valores dos testes</b> |  |    |    |                                    |        |
| <b>Qui-quadrado</b>       | $\chi^2 = 0,8249$ ; gl=1; p* = 0,3638      |    |    | $\chi^2 = 0,8$ ; gl=1; p* = 0,3711 |        |
| <b>Odd ratio</b>          | OR = 1,15; IC <sup>95%</sup> = [0,85;1,57] |    |    |                                    |        |

\*Valor significativo para o p<0,05 para o teste de  $\chi^2$   
 IC<sup>95%</sup>: Intervalo de confiança de 95% para o OR

**Tabela 10** Análise de associação para o polimorfismo rs689466

|                           | <i>Trend</i>                              |     |    | <i>Allelic</i>                        |        |
|---------------------------|---|-----|----|---------------------------------------|--------|
|                           | AA  | AG  | GG | A                                     | G      |
| <b>Casos</b>              | 107                                       | 85  | 33 | 0,6156                                | 0,3844 |
| <b>Controles</b>          | 170                                       | 126 | 56 | 0,5995                                | 0,4005 |
| <b>Valores dos testes</b> |   |     |    |                                       |        |
| <b>Qui-quadrado</b>       | $\chi^2 = 0,3004$ ; gl=1; p* = 0,5837     |     |    | $\chi^2 = 0,2988$ ; gl=1; p* = 0,5846 |        |
| <b>Odd ratio</b>          | OR= 0,93; IC <sup>95%</sup> = [0,73;1,19] |     |    |                                       |        |

\*Valor significativo para o p<0,05 para o teste de  $\chi^2$   
 IC<sup>95%</sup>: Intervalo de confiança de 95% para OR

Assim, o estudo não mostrou evidência estatística suficiente a favor da hipótese de associação entre as variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* e susceptibilidade ao câncer gástrico na população peruana.



## 5. DISCUSSÃO

Foi evidenciado que a enzima *COX2*, desempenha uma função importante no desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer nos seres humanos (DUBOIS *et al.*, 1998). A expressão do gene *COX2* é regulada por proteínas nucleares que interagem com os elementos *cis* na região promotora do *COX2* e desempenham um papel decisivo na transcrição de genes (DIXON *et al.*, 2003). As variantes genéticas na região promotora do *COX2* podem, portanto, ter impacto na atividade de transcrição do gene pela alteração da capacidade de ligação com certas proteínas nucleares. Estudos prévios têm demonstrado que SNPs na região promotora variam nas diferentes populações (PANGULURI *et al.*, 2004).

A população peruana é resultado da miscigenação de três populações parentais: africana, européia e ameríndia. As informações das variantes genéticas do gene *COX2* para os africanos e europeus se encontram disponíveis no banco de dados públicos *SeattleSNPs*, entretanto, para ameríndios não existe essa informação. Por essa razão, o sequenciamento do gene *COX2* de ameríndios neste trabalho permitiu obter as informações das variantes genéticas da região promotora do gene. A partir destas informações foi caracterizado o padrão de diversidade genética do gene *COX2* em ameríndios da etnia Quéchua.

Além disso, a genotipagem de duas variantes genéticas permitiu determinar os genótipos dos indivíduos com e sem câncer gástrico, e assim testar se essas variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* estão associadas com o risco de desenvolver câncer gástrico na população miscigenada do Peru. Também foram determinados os genótipos de indivíduos da população ameríndia (Ashaninkas, Shimaas e Quéchuas) para essas duas variantes genéticas, com a finalidade de conhecer a dinâmica das frequências alélicas de etnias diferentes, e saber se essas frequências diferem com as da população miscigenada do Peru.

O sequenciamento do gene *COX2* foi feito previamente por vários pesquisadores (COX *et al.*, 2001; HALUSHKA *et al.*, 1999). Neste estudo, o sequenciamento do gene permitiu a identificação de seis SNPs da região promotora do gene *COX2* na população ameríndia do Peru, dos quais três SNPs – rs20417, rs689465 e rs689466 – são mais frequentes, apresentando  $MAF > 5\%$ , e três são SNPs novos com uma  $MAF = 0,02$ .

Estes três SNPs mais frequentes também foram encontrados na população da China (ZHANG *et al.*, 2005) e na população do Brasil, sendo que na população brasileira também foram identificados outros SNPs: rs20415, rs20419, rs5270 e rs20424 (PIRANDA *et al.*, 2010). Neste estudo não foram encontradas outras variantes genéticas, presentes nos africanos

e europeus, além das reportadas em outros estudos: rs3918304A>G, rs20415G>A, -490C>G, e rs5270C>G (PAPAFILI *et al.*, 2002; PANGULURI *et al.*, 2004).

As frequências das MAFs para as variantes rs20417C, rs689465G e rs689466G são heterogêneas nas diferentes populações: Peru (0,15; 0,15; 0,46), Brasil (0,32; 0,22; 0,15) e China (0,02; 0,04; 0,49), respectivamente (ZHANG *et al.*, 2005; PIRANDA *et al.*, 2010).

As frequências das variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* obtidas neste trabalho são compatíveis com a proposta de Panguluri *et al.* (2004) em que as variantes genéticas e suas frequências na região promotora variam especialmente entre populações de etnias diferentes. Isto foi demonstrado para a variante genética rs20417, que apresenta uma frequência maior do alelo C (alelo menor) em países da Europa e América (17%-32%), do que em países da Ásia (2%-5%), com exceção da Índia, cuja frequência do alelo C foi 16,2% (SAXENA *et al.*, 2008).

Na análise do padrão de desequilíbrio de ligação (DL) observou-se que nos europeus o DL foi de 87% entre as variantes rs20417 e rs689465, diminuindo esse valor para 72% nos ameríndios da etnia Quéchuas, e nos africanos esse valor foi bem menor (15%). Entretanto, observou-se uma correlação de 81% entre as variantes rs20415 e rs20419 nos africanos, mas essas variantes não estão presentes nos europeus e ameríndios.

O desequilíbrio de ligação (72%) estimado em ameríndios, para as variantes rs20417 e rs689465, através deste estudo foi diferente dos valores obtidos por Zhang *et al.* (2005), que obteve um valor de DL de 22% na população chinesa, e na população brasileira o DL encontrado foi de 31% (PIRANDA *et al.*, 2010). Os padrões divergentes de DL entre populações africanas e não africanas podem ser explicados pelo modelo demográfico da evolução humana (TISHKOFF; VERRELLI, 2003).

Os valores encontrados para as estimativas de diversidade intra-populacional, tal como a diversidade haplotípica e nucleotídica ( $\pi$  e  $\theta_w$ ) foram maiores para os africanos, e menores para os ameríndios e europeus. Este resultado é similar ao estudo de Halushka *et al.* (1999) que também estimou valores de diversidade nucleotídica maiores nos africanos que nos europeus, refletindo a maior diversidade esperada da população africana (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994). Tishkoff *et al.* (2003) mencionam que o padrão de diversidade nas populações humanas é influenciado pela história demográfica passada (incluindo flutuações no tamanho efetivo da população, sub-estruturação e migração) e pelas forças evolutivas, tais como a deriva genética, migração, seleção natural, assim como as taxas de mutação e recombinação (TISHKOFF; VERRELLI, 2003).

No estudo caso-controle, foi avaliado se as duas variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* – rs689465 e rs689466 – estão associadas com o risco de desenvolver o câncer gástrico na população miscigenada do Peru, sendo que os resultados não encontraram associação na população avaliada neste estudo. Porém, existem evidências na literatura de que essas duas variantes estão associadas com a doença de câncer gástrico nas populações da Ásia. Os estudos anteriores reportaram que três polimorfismos da região promotora do gene *COX2* (rs20417G>C, rs689465A>G e rs689466G>A) estão associados com a susceptibilidade ao câncer gástrico (ZHANG *et al.*, 2006).

Os estudos de associação para variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* e a susceptibilidade ao câncer gástrico estão detalhados na Tabela 11. Observa-se que foi encontrada associação dessas variantes com o câncer gástrico nas populações da Ásia, mas não em populações estudadas de outros países.

**Tabela 11** Estudos de associação de polimorfismos da região promotora do gene *COX2* e o câncer gástrico em diferentes populações

| <b>rs20417 G&gt;C</b>        |             |              |                  |            |                              |
|------------------------------|-------------|--------------|------------------|------------|------------------------------|
| <i>Estudos</i>               | <i>País</i> | <i>Casos</i> | <i>Controles</i> | <i>MAF</i> | <i>OR (IC<sup>95%</sup>)</i> |
| Pereira <i>et al.</i> , 2006 | Portugal    | 73           | 210              | 0,22       | 1,67 (0,98-2,86)             |
| Liu <i>et al.</i> , 2006     | China       | 388          | 427              | 0,05       | 1,08 (0,69-1,70)             |
| Zhang <i>et al.</i> , 2006   | China       | 323          | 646              | 0,02       | <b>2,90 (1,71-4,91)*</b>     |
| Hou <i>et al.</i> , 2007     | Polônia     | 290          | 409              | 0,16       | 0,91 (0,65-1,27)             |
| Zhu <i>et al.</i> , 2008     | China       | 140          | 125              | 0,06       | <b>1,96 (1,07-3,59)*</b>     |
| Saxena <i>et al.</i> , 2008  | India       | 62           | 241              | 0,16       | <b>8,38 (4,34-16,16)*</b>    |
| Sitarz <i>et al.</i> , 2008  | Holanda     | 241          | 100              | 0,25       | 0,53 (0,33-0,87)             |
| Tang <i>et al.</i> , 2009    | China       | 100          | 105              | 0,06       | <b>2,14 (1,20-4,84)*</b>     |
| <b>rs689466 A&gt;G</b>       |             |              |                  |            |                              |
| <i>Estudos</i>               | <i>País</i> | <i>Casos</i> | <i>Controles</i> | <i>MAF</i> | <i>OR (IC<sup>95%</sup>)</i> |
| Liu <i>et al.</i> , 2006     | China       | 389          | 427              | 0,50       | <b>1,41 (1,01-1,98)*</b>     |
| Zhang <i>et al.</i> , 2006   | China       | 323          | 646              | 0,52       | <b>2,43 (1,61-3,66)*</b>     |
| Jiang <i>et al.</i> , 2007   | China       | 254          | 304              | 0,26       | 1,17 (0,77-1,77)             |
| <b>rs689465 A&gt;G</b>       |             |              |                  |            |                              |
| Zhang <i>et al.</i> , 2006   | China       | 323          | 646              | 0,04       | <b>1,55 (1,01-2,39)*</b>     |

\* Estudos associados com o risco de desenvolver o câncer gástrico.

No trabalho de Liu *et al.* (2006) observou-se que o aumento da susceptibilidade é maior em indivíduos de genótipo AA, com infecção pelo *H. pylori* (OR=2,64; IC<sup>95%</sup>=1,47-4,74) e fumante (OR=2,81; IC<sup>95%</sup>=1,43-5,53). Além disso, este polimorfismo também parece estar envolvido no desenvolvimento do câncer gástrico em pacientes com metaplasia intestinal (SUN *et al.* 2004).

Todas essas associações podem ser biologicamente compatíveis. Os estudos de Papafili *et al.* (2002) demonstraram que a variante rs20417 na região promotora do gene *COX2* inibe a ligação do fator de transcrição Sp1, resultando em uma redução da atividade promotora. Entretanto, Szczeklik *et al.* (2004) sugeriu que essa variante criaria o sítio de reconhecimento do fator de transcrição E2F, que poderia levar ao aumento da atividade da transcrição do gene *COX2*. Por outro lado, a variante rs689465 também criaria uma sequência de reconhecimento para o fator de transcrição c-MYB, resultando em uma maior atividade de transcrição do gene *COX2* (ZHANG *et al.*, 2005).

Apesar dos estudos anteriores terem demonstrado associação das variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* e o câncer gástrico em diferentes populações da Ásia neste estudo não foi encontrada essa associação na população peruana. Os estudos de Pereira *et al.* (2006) na população de Portugal e Hou *et al.* (2007) na população da Polônia também não encontraram a associação.

Tabor *et al.* (2002) menciona que a maioria das associações reportadas na literatura não é confirmada por estudos posteriores. A explicação mais provável é que a maioria dos estudos iniciais seria falso positivo, devido ao fato de que os controles não seriam escolhidos adequadamente. Outra explicação pode ser o viés de miscigenação da população, se, por exemplo, uma doença apresenta uma maior incidência em um dos três grupos étnicos principais (europeus, ameríndios ou africanos) que contribuíram na formação da população miscigenada, este grupo étnico pode estar super-representado na amostra de casos em estudos casos-controle. Nesta situação, qualquer variante gênica associada estatisticamente com o grupo étnico de maior incidência, vai apresentar associação com a doença, independentemente do seu envolvimento na patogênese, podendo levar a resultados falsos positivos. Em populações miscigenadas é necessário controlar o efeito da ancestralidade genômica, o que pode ser feito estudando Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) (TARAZONA-SANTOS *et al.*, 2007).

Outra possibilidade seria a existência de uma interação gene-ambiente, no qual as frequências das variantes genéticas do gene seriam influenciadas pelo meio ambiente, existindo heterogeneidade nas frequências em diferentes populações.

O resultado de não associação no presente trabalho também pode ser devido ao pequeno tamanho amostral que diminui a potência estatística no estudo.

## 6. CONCLUSÕES

- ☑ Este é o primeiro trabalho descrevendo as variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* na população ameríndia do Peru. Foram identificados seis polimorfismos, dos quais três são novos e três são comuns (MAF>5%) nas três populações parentais (africanos, europeus e ameríndios): rs20417, rs689465 e rs689466.
- ☑ Foi caracterizado através das análises de genética de populações o padrão de diversidade genética da região promotora do gene *COX2* em indivíduos da população parental ameríndia do Peru. Sendo que a diversidade haplotípica e nucleotídica nos nativos americanos é maior que nos europeus e menor que nos africanos, assim também as três populações parentais do Peru apresentam uma diferenciação genética significativa.
- ☑ Duas variantes genéticas da região promotora do gene *COX2* são informativas para testar a associação com o câncer gástrico: rs689466 e rs689465, sendo esta última um tagSNP.
- ☑ As frequências alélicas nos indivíduos com câncer gástrico (casos) e sem câncer gástrico (controles) são similares aos indivíduos ameríndios (Quéchuas e Shimaas) com a exceção dos Ashaninkas que apresentaram frequências contrastantes.
- ☑ Neste estudo não foi observada associação entre as variantes genéticas rs689465 e rs689466 da região promotora do gene *COX2* e o câncer gástrico na população do Peru.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLEBY, S. B.; RISTIMÄKI, A.; NEILSON, K.; NARKO, K.; HLA, T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *The Biochemical journal*, v. 302, n. 3, p. 723-7, 1994.

AZUMA, T.; YAMAKAWA, A.; *et al.* Distinct diversity of the cag pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 2508-2517, 2004.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature reviews. Genetics*, v. 7, n. 10, p. 781-91, 2006.

BANDI, P.; BARRERA, E.; CASARES, C.; *et al.* Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos / Latinos 2009-2011 (S. A. D. Cáncer, Ed.) p.37. Atlanta, 2011.

BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* (Oxford, England), v. 21, n. 2, p. 263-5, 2005.

BOYLE, P.; LEWIN, B. (EDS.). World Cancer Report 2008. p.503. Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer*, 2008.

BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D.; ARNDT, V. Cancer Epidemiology (M. Verma, Ed.) *Cancer*. v. 472, p.467-477. Totowa, NJ: *Humana Press*. 2009.

CAO, Y.; PRESCOTT S.M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol*, v. 190, p. 279-286, 2002.

CAVALLI-SFORZA, L.L; MENOZZI, P; PIAZZA, A. The History and Geography of Human Genes. *Princeton University Press*, Princeton, 1994.

CERELLA, C.; SOBOLEWSKI, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Targeting COX-2 expression by natural compounds: A promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochemical pharmacology*, v. 2. Elsevier Inc., 2010.

CHECA, M. A. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas*, v. 20, n. 3, p. 213-221, 2007.

COX, D.; BOILLOT, C.; CANZIAN, F. Data mining: Efficiency of using sequence databases for polymorphism discovery. *Human mutation*, v. 17, n. 2, p. 141-50, 2001.

DAVIS, J. N.; MCCABE, M. T.; HAYWARD, S. W.; PARK, J. M.; DAY, M. L. Disruption of Rb/E2F pathway results in increased cyclooxygenase-2 expression and activity in prostate epithelial cells. *Cancer research*, v. 65, n. 9, p. 3633-42, 2005.

DIXON, D.A. Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Prog Exp Tumor Res*, v. 37, p. 52–71, 2003.

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. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 25, n. 6, p. 1042-50, 2010.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; *et al.* Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 12, n. 12, p. 1063-73, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, v. 8, n. 3, p. 186-94, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, v. 8, n. 3, p. 175-85, 1998.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, v. 127, 2010.

FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, v. 133, n. 3, p. 693-709, 1993.

GARZA-GONZALES, E.; BOSQUES-PADILLA, F. J.; EL-OMAR, E.; HOLD, G.; TIJERINA-MENCHACA, R.; MALDONADO-GARZA, H. J.; PEREZ-PEREZ, G. I. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RNeTNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer*, v. 114, p. 237-41, 2005.

GISBERT, J. P.; PAJARES, J. M. Ciclooxygenasa 2 (COX-2), *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Medicina Clínica*, v. 120, n. 5, p. 189-193, 2003.

GLOBOCAN. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. .2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 07 de Nov. 2010.

GOMEZ, N. A.; ORTEGA, F.; CASTILLO, D. CANCER GASTRICO. (N. Gomez, Ed.) *IntraMed*. Guayaquil, Ecuador. Disponível em: <[http://www.intramed.net/sitios/librovirtual8/pdf/8\\_02.pdf](http://www.intramed.net/sitios/librovirtual8/pdf/8_02.pdf)>. Acesso em: 05 de set. 2010.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, PHIL. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research*, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GYULAI, Z.; KLAUSZ, G.; TISZAI, A.; LENART, Z.; KASA, I. T.; LONOVICS, J.; MANDI, Y. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw*, v. 15, p. 353-8, 2004.



HALUSHKA, M.K.; FAN, J.B.; BENTLEY, K.; HSIE, L.; SHEN, N.; WEDER, A.; COOPER, R.; LIPSHUTZ, R.; CHAKRAVARTI, A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature Genetics*, v. 22, n. 3, p. 239–247, 1999.

HOU, L; GRILLO, P; ZHU, Z.Z; LISSOWSKA, J; YEAGER, M; ZATONSKI, W; ZHU, G; BACCARELI, A; CHANOCK, S.J; FRAUMENI, J.F; CHOW, W.H. COX1 and COX2 polymorphisms and gastric cancer risk in a Polish population. *Anticancer Res*, n 27, p. 4243-4247, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; *et al.* Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 59, n. 4, p. 225-49, 2009.

JIANG, G.J; WANG, H.M; ZHOU, Y; TAN, Y.F; DING, W.L; GAO, J; KE, Q; WANG, Y; SHEN, J; XU, Y.C; SHEN, H.B. The correlation study between the nucleotide polymorphisms of cyclooxygenase-2 gene and the susceptibility to gastric cancer. *Nanjing Yike Daxue Xuebao*, v. 27, p. 890-894, 2007.

JORGENSEN, T. J.; RUCZINSKI, I.; KESSING, B.; *et al.* Practice of Epidemiology Hypothesis-Driven Candidate Gene Association Studies : Practical Design and Analytical Considerations. *American journal of epidemiology*, v. 170, n. 8, p. 986-993, 2009.

KIKUCHI, S.; CRABTREE, J. E.; FORMAN, D.; KUROSAWA, M. Association between infections with CagA-positive or -negative strains of *Helicobacter pylori* and risk for gastric cancer in young adults. *Am J Gastroenterol*, v. 94, p. 3455–9, 1999.

KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual review of biomedical engineering*, v. 9, p. 289-320, 2007.

KOSAKA, T.; MIYATA, A.; IHARA, H.; *et al.* Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 221, n. 3, p. 889-97, 1994.

KUIPERS, E. J.; PEREZ-PEREZ, G. I.; MEUWISSEN, S. G.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst*, v. 87, p. 1777–80, 1995.

LAURÉN, P. The two histological main type of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histoclinical classification. *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, v. 64, p. 31-49, 1965.

LEE, W. H.; VEGA, V. B. Heterogeneity detector: finding heterogeneous positions in Phred/Phrap assemblies. *Bioinformatics* (Oxford, England), v. 20, n. 16, p. 2863-4, 2004.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* (Oxford, England), v. 25, n. 11, p. 1451-2, 2009.

LIN, H.J.; LAKKIDES , K.M., KEKU, *et al.* Prostaglandin H synthase 2 variant (Val511Ala) in African Americans may reduce the risk for colorectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 11, p. 1305–1315, 2001.

LIU, F.; PAN, K.; ZHANG, XUEMEI; *et al.* Genetic variants in cyclooxygenase-2: Expression and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. *Gastroenterology*, v. 130, n. 7, p. 1975-84, 2006.

LIU, J.-LI; LIANG, Y.; WANG, Z.-NING; ZHOU, X.; XING, L.-LI. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and susceptibility to gastric carcinoma: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 16, n. 43, p. 5510-5517, 2010.

LIVAK, K. J. Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols (Kwok, P-Y, Ed.) Human Immunology. v. 64, p.263. Totowa, NJ: *Humana Press Inc.*, 2003.

LIVINGSTON, R.J.; VON NIEDERHAUSEM, A. JEGGA, A.G.; CRAWFORD, D.C.; CARLSON, C.S.; RIEDER, M.J.; GOWRISANKAR, S.; ARONOW, B.J.; WEISS, R.B.; NICKERSON, D.A. Pattern of sequence variation across 213 environmental response genes. *Genome Res*, v. 14, p. 1821-31, 2004.

MACHADO, M; MAGALHAES, WCS; SENE, A; ARAUJO, B; FARIA-CAMPOS, AC; CHANOCK, SJ; SCOTT, Leandro; CORREA-OLIVEIRA, G; TARAZONA-SANTOS, E; RODRIGUES, M. Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics re-sequencing studies. *Journal Investigative Genetics*, 2010. In press.

NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics. New York, USA: *Princeton University Press*, 1987.

NICKERSON, D. A.; TOBE, V. O.; TAYLOR, S. L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 14, p. 2745-51, 1997.

PACKER, B.R.; YEAGER, M.; BURDETT, L.; WELCH, R.; BEERMAN, M.; QI, L.; SICOTTE, H.; STAATS, B.; ACHARYA, M.; CRENSHAW, A.; ECKERT, A.; PURI, V.; GERHARD, D.S.; CHANOCK, S.J. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation, assay development,efrequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res*, v. 34, p. 617-21, 2006.

PANGULURI, R.C.K., LONG, L.O., CHEN, W. *et al.* COX-2 gene promoter haplotypes and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*, v. 25, p. 961-6, 2004

PAPAFILI, A.; HILL, M.; BRULL, D. J.; *et al.* Common Promoter Variant in Cyclooxygenase-2 Represses Gene Expression: Evidence of Role in Acute-Phase Inflammatory Response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 22, p. 1631-1636, 2002.

PEREIRA, C., SOUZA, H., FERREIRA, P., FRAGOSO, M., MOREIRA-DIAS, L., LOPES, C., MEDEIROS, R., DINIS-RIBEIRO, M. -765G > C COX-2 polymorphism may be a susceptibility marker for gastric adenocarcinoma in patients with atrophy or intestinal metaplasia. *World J Gastroenterol*, v. 12, n. 34, p.5473-8, 2006

PEREZ-PEREZ, G. I.; GARZA-GONZALEZ, E.; PORTAL, C.; OLIVARES, A. Z. Role of cytokine polymorphisms in the risk of distal gastric cancer development. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 14, n. 8, p. 1869-73, 2005.

PHAROAH, P. D. P.; DUNNING, A. M.; PONDER, B. A. J.; EASTON, D. F. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nature reviews. Cancer*, v. 4, n. 11, p. 850-60, 2004.

PIRANDA, D. N.; FESTA-VASCONCELLOS, J. S.; AMARAL, L. M.; BERGMANN, A.; VIANNA-JORGE, R. Polymorphisms in regulatory regions of Cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer*, v. 10, n. 1, p. 613, 2010.

RAMÍREZ, A.; SÁNCHEZ, R. *Helicobacter pylori* y Cáncer gástrico. *Rev Gastroenterol Perú*, v. 28, p. 258-266, 2008.

REZNEK, R. H. (ED.). Gastric Cancer Gastric Cancer. p.213. New York, USA: *Cambridge University Press*, 2010.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers (S. Krawetz & S. Misener, Eds.). p.365-386. Totowa, NJ: *Humana Press*, 2000.

SAVAGE, S. A.; ABNET, C. C.; MARK, S. D.; QIAO, Y. L.; DONG, Z. W.; DAWSEY, S. M.; TAYLOR, P. R.; CHANOCK, S. J. Variants of the IL8 e IL8RB geneserisk for gastric cardia adenocarcinomaesophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 13, p. 2251-7, 2004.

SAXENA, A.; PRASAD, K.-N.; GHOSHAL, U.-C.; *et al.* Polymorphism of -765G > C COX-2 is a risk factor for gastric adenocarcinoma and peptic ulcer disease in addition to H pylori infection: a study from northern India. *World journal of gastroenterology*, v. 14, n. 10, p. 1498-503, 2008.

SEEB, J. E.; PASCAL, C. E.; RAMAKRISHNAN, R.; SEEB, L. W. Single Nucleotide Polymorphisms (A. A. Komar, Ed.) *Methods in Molecular Biology*. v. 578, p.277-292. Totowa, NJ: *Humana Press*, 2009.

SIERRA, M.; LINARES, P.; MAURIZ, J.; DIEZ, R.; OLCOZ, J. *Helicobacter pylori* y carcinogénesis gástrica. *Asociación Castellana de Aparato Digestivo*, v. XXIV, n. 4, p. 133-137, 2008.

SITARZ, R; LEGUIT, R.J; DE LENG, W.W; POLAK, M; MORSINK, F.M; BAKKER, O; MACIEJEWSKI, R; OFFERHAUS, G.J; MILNE, A.N. The COX-2 promoter polymorphism -765 G>C is associated with early-onset, conventional and stump gastric cancers. *Mod Pathol*, v. 21, p. 685-690, 2008.

SOTO, G; BAUTISTA, C.T; ROTH, D.E; GILMAN, R.H; VELAPATINO, B; OGURA, M; DAILIDE, G; RAZURI, M; MEZA, R; KATZ, U; MONATH, T.P; BERG, D.E; TAYLOR, D.N; GASTROINTESTINAL PHYSIOLOGY WORKING GROUP IN PERU. *Helicobacter pylori* reinfection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy. *J Infect Dis*, v. 188, p. 1263-75, 2003.

SUN, W.H; YU, Q; SHEN, H; OU, X,L; CAO, D,Z; YU, T; QIAN, C; ZHU, F; SUN, Y.L; FU, X.L; SU, H. Roles of *Helicobacter pylori* infection and cyclooxygenase-2 expression in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, v. 10, n. 19, p. 2809-2813, 2004.

STEPHENS, M; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American journal of human genetics*, v. 68, n. 4, p. 978-89, 2001.

STEPHENS, MATTHEW; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American journal of human genetics*, v. 76, n. 3, p. 449-62, 2005.

SZCZEKLIK, W.; SANAK, M.; SZCZEKLIK, A. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, v. 114, n. 2, p. 248-53, 2004.

TABOR, H. K.; RISCH, N. J.; MYERS, R. M. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Genetics*, v. 3, n. May, p. 1-7, 2002.

TAMURA, K; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, v. 10, p. 512-526, 1993.

TANG, X,F; LI, Y.M; LI, S.X; LI, X; HE, W.T; ZHANG, D; ZHANG, Q,B; ZHU, K,H. Correlation between the nucleotide polymorphisms of COX-2 and the susceptibility to gastric cancer in Hui ethnic group. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, v. 17, p. 1772-1776, 2009.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, v. 105, n. 2, p. 437-60, 1983.

TAJIMA, F. DNA Polymorphism in a Subdivided Population: The Expected Number of Segregating Sites in the Two-Subpopulation Model. *Genetics*, n. 123, p. 229-240, 1989.

TARAZONA-SANTOS, E; RAIMONDI, S; FUSELLI, S. Controlling the effects of population stratification by admixture in pharmacogenetics. In: Guilherme Suarez-Kurtz. (Editor): Pharmacogenomics in Admixed populations. Austin, TX: *Landes Bioscience*, p.1-16, 2007.

TEDESCHI, N. D. *Oncologia Molecular* (C. G. Ferreira & J. C. Rocha, Eds.). Primeria ed., p.469. Belo Horizonte, Brasil: *Atheneu*, 2006.

THE INTERNATIONAL HapMap CONSORTIUM. A haplotype map of the human genome. *Nature*, v. 437, p. 1299-1320, 2005.

TISHKOFF, S. A; VERRELLI, B. C. Patterns of human genetic diversity: implications for human evolutionary history and disease. *Annual review of genomics and human genetics*, v. 4, p. 293-340, 2003.

VILAICHONE, R. K.; MAHACHAI, V.; TUMWASORM, S.; WU, J. Y.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. Molecular epidemiology and outcome of *Helicobacter pylori* infection in Thailand: a cultural cross roads. *Helicobacter*, v. 9, p. 453-459, 2004.

WANG, D.; MANN, J.R.; DUBOIS, R.N. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, v. 128, p. 1445-1461, 2005.

WATTERSON, G. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, v. 7, n. 2, p. 256-276, 1975.

YAMAOKA, Y.; MOTOTSUGU, K.; MASAHIRO. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence Can be Explained by Differences between *Helicobacter pylori* Strains. *Internal Medicine*, v. 47, n. 12, p. 1077-1083, 2008.

ZHANG, X; MIAO, X.; TAN, W.; *et al.* Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association With Risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology*, v. 129, n. 2, p. 565-576, 2005.

ZHANG, X., MIAO, X., TAN, W., *et al.* Genetic polymorphisms in the promoter region of cyclooxygenase-2 and their association with risk of gastric cancer. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, v. 28, p. 28:119–123, 2006.

ZHU, K,X; LI, Y.M; LI, X; SHI, B; ZHOU, W.C; SHAN, Y; LIU, T; HE, W,T; FENG, T.L. Association of COX-2 genetic polymorphisms and *H. pylori* infection with gastric cancer in high-incidence Hexi area of Gansu Province in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, v. 16, p. 2364-2370, 2008.

## 8. ANEXOS

### *ANEXO 1: protocolo de extração de DNA utilizando o Kit da Gentra*

O protocolo de extração de DNA a partir de sangue total utilizado o Kit *Gentra*® *Puregene*® *Blood Kit* (*Qiagen*), foi adaptado no Laboratório de Diversidade Genética Humana, e realizado segundo os seguintes passos:

1. Coloque 900µL de *RBC Lysis Solution* em um tubo de 1,5mL.
2. Adicione 300µL de sangue total e misture invertendo o tubo por 10 vezes.  
→ *Todo material contaminado por sangue humano usado na extração deve ser descartado em solução de hipoclorito de sódio 20% (a água sanitária de uso doméstico já está nessa concentração) por no mínimo 48 horas.*
3. Incube por 1 minuto, a temperatura ambiente (15–25°C). Inverta o tubo pelo menos uma vez durante a incubação. Para sangue fresco (coletado há 1h antes do início da extração) aumente o tempo de incubação para 3 minutos para garantir a lise completa das células vermelhas.
4. Centrifugue por 1 minuto a 13.000 rpm para precipitar as células brancas.
5. Descarte cuidadosamente o sobrenadante, deixando aproximadamente 10µL do líquido residual e o pellet.
6. Vortexe os tubos vigorosamente para ressuspender o pellet no líquido residual. A vortexagem facilita muito a lise celular no próximo passo (o pellet deve desaparecer completamente após o vortex).  
→ *A RBC pode ser repetida por mais uma vez caso a lise não tenha sido eficiente.*
7. Adicione 300µL de *Cell Lysis Solution* e pipete repetitivamente para lisar as células ou vortexe vigorosamente por 10 segundos. Normalmente não é necessário incubar, no entanto, se os grumos de células forem visíveis, incube a 37°C até que a solução fique homogênea. As amostras são estáveis em *Cell Lysis Solution* pelo menos 2 anos a temperatura ambiente.
8. Adicione 5-10ul de Proteinase K (20mg/ul) e vortexe. Incube a 57°C por no mínimo 2h ou *overnight*. (Vortexe o tubo algumas vezes durante o intervalo de incubação)
9. Se quiser um DNA livre de RNA, adicione 1.5µL de RNaseA (10mg/ml), e misture invertendo o tubo 25 vezes. Incube por 15 minutos a 37°C ou por 30 minutos a

temperatura ambiente. Incube por 1 minuto no gelo para esfriar a amostra rapidamente caso incube a 37°C.

10. Adicione 100µL *Protein Precipitation Solution*, e vortexe vigorosamente por 20 segundos a alta velocidade.
11. Centrifugue por 3 minutos a 13 000rpm. O precipitado de proteínas deve formar um pellet marrom escuro firme. Se o pellet de proteína não estiver firme, incube por 5 minutos no gelo e repita a centrifugação.  
→ *Opcional: após a centrifugação, transfira o sobrenadante para um tubo limpo e repita a centrifugação (3 minutos, velocidade máxima) para que toda a proteína seja eliminada da amostra.*
12. Pipete 300µL de Isopropanol 100% em um tubo de 1,5mL limpo e adicione o sobrenadante do passo anterior, despejando cuidadosamente. Certifique-se de que o pellet de proteína não seja pipetado.
13. Imediatamente inverta gentilmente o tubo 50 vezes até que o DNA seja visível.
14. Centrifugue por 3 minutos a 13 000 rpm. O DNA será visível como um pequeno pellet branco.
15. Descarte cuidadosamente o sobrenadante e vire o tubo sobre um papel absorvente limpo. Cuidado para que o pellet permaneça no tubo.
16. Adicione 300µL de Etanol 70% e centrifugue por 1 minuto a 13 000 rpm.
17. Descarte cuidadosamente o sobrenadante e vire o tubo sobre um papel absorvente limpo. Cuidado para que o pellet permaneça no tubo. Deixe o etanol evaporar. Evite secar demasiadamente o pellet, pois será mais difícil dissolver.
18. Adicione 50µL de *Low TE* (a quantidade de Low TE pode variar dependendo do pellet de DNA obtido). Incube a 65°C por 5 minutos (ou a 37°C por 1 hora), para dissolver o DNA.
19. Quantifique o DNA da amostra usando o Nanodrop. Transfira o DNA para um tubo de tampa de rosca devidamente identificado e congele a amostra.

## ***ANEXO 2: protocolo de extração de DNA com Fenol-Clorofórmio***

O protocolo de extração de DNA a partir de coágulo utilizado Fenol-Clorofórmio, foi adaptado no *Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas-Peru*, e realizado de acordo os procedimentos descritos abaixo:

1. Colocar 500 µl de sangue com coágulo em um tubo de 1,5mL
2. Adicionar 800 µl de Tampão de lavagem (10 mM Tris HCl pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl), homogeneizar manualmente e centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
3. Descartar o sobrenadante
4. Adicionar novamente o Tampão de lavagem até completar 1mL. Homogeneizar e centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
5. Descartar o sobrenadante
6. Repetir a lavagem por mais 3 vezes
7. Adicionar 500 µl de Tampão de Lavagem e ressuspender o *pellet*
8. Adicionar 25 µl de Sulfato Duodecil de Sódio a 10%, e 12,5 µl de proteinase K a 20 mg/ml
9. Incubar por toda a noite a 37°C
10. No dia seguinte adicionar 500 µl de Fenol-Cloroformio-Álcool isoamílico na proporção de 25: 24: 1, homogeneizar e centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
11. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo (fase transparente), adicionar 500 µl de Clorofórmio na proporção 24:1, homogeneizar e centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
12. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e adicionar 600 µl de álcool absoluto frio e 100 µl de Acetato de sódio 3M (pH 6,0)
13. Homogeneizar manualmente cada tubo e deixar a - 70°C por 15 minutos ou por - 20°C por 1 hora
14. Centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C
15. Descartar o sobrenadante
16. Lavar o *pellet* com 600 µl de etanol 70%, centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
17. Repetir a lavagem com etanol 70%
18. Descartar o sobrenadante e deixar secar a 37°C ou a temperatura ambiente
19. Ressuspender o DNA em 50 µl ou mais de TE (Tris EDTA) pH 7.2



### ***ANEXO 3: purificação dos produtos de PCR com polietilenoglicol (PEG)***

A purificação dos produtos de PCR com PEG é um método prévio ao sequenciamento, que permite eliminar bandas de DNA menores a 300-400 pb, e foi realizado segundo os seguintes procedimentos:

1. Transferir o produto de PCR para tubos de 500 $\mu$ L
2. Adicionar o mesmo volume de solução de PEG 20% (NaCl 2,5 M + PEG 20%) e vortexar bem
3. Deixar os tubos em banho-maria a 37 °C por 15 minutos (no mínimo, mas pode ser mais do que isso)
4. Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm
5. Retirar cuidadosamente o sobrenadante com pipeta
6. Adicionar 125  $\mu$ l de etanol 80% gelado
7. Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm
8. Retirar cuidadosamente o sobrenadante com pipeta
9. Repetir mais uma vez os passos 6, 7 e 8, tentando descartar o máximo possível do etanol restante
10. Deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C até não restarem vestígios de etanol no tubo
11. Resuspender o DNA em água milliQ em volume proporcional à concentração inicial do DNA (ex. 14 $\mu$ L se começou usando 18 $\mu$ L de produto de PCR e a banda de DNA no gel foi média ou forte).

## ***ANEXO 4: sequenciamento no ABI3130***

O sequenciamento foi feito de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do *kit BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems)*.

1. O sequenciamento é realizado por meio da reação com volume final de 10 $\mu$ L contendo:
  - 2 $\mu$ L de DNA<sup>+</sup>
  - 3,4 $\mu$ L de água destilada
  - 2 $\mu$ L de primer 0,8  $\mu$ M
  - 0,8 $\mu$ L de BigDye

<sup>+</sup>Se o PEG estiver muito bom pode-se colocar 1 $\mu$ l de DNA incrementando a quantidade de água.

2. A ciclagem consistiu das seguintes condições:

| <i><b>Etapas</b></i>    | <i><b>Rampa</b></i> | <i><b>Temperatura</b></i> | <i><b>Tempo</b></i> | <i><b>Nº ciclos</b></i> |
|-------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|
| 1. Desnaturação inicial | Rápida              | 96°C                      | 1 minuto            |                         |
| 2. Desnaturação         | rampa               | 96°C                      | 15 segundos         |                         |
| 3. Anelamento           | termal*             | 50°C                      | 15 segundos         | 44                      |
| 4. Extensão             | para                | 60°C                      | 4 minutos           |                         |

\*Rápida rampa termal consiste em 1 °C/segundo, o que facilita o anelamento do *primer*.

3. Ao finalizar com a última etapa do sequenciamento, conservar a reação a 4°C até sua purificação.

## ***ANEXO 5: precipitação da placa de sequenciamento ABI3130***

1. Para 10 $\mu$ L da reação de sequenciamento preparar um mix (para uma amostra) com as seguintes soluções (mantidos a temperatura ambiente):
  - 60 $\mu$ L de etanol absoluto
  - 3 $\mu$ L de acetato de sódio 3M
  - 27 $\mu$ L de água destilada
2. Adicionar 90 $\mu$ L do mix em cada produto seqüenciado y deixar a temperatura ambiente por 15 minutos invertendo algumas vezes.
3. Centrifugar por 30 minutos a 3 000 rcf (3 500 rpm, isso depende do rotor da centrifuga).
4. Adicionar 150 $\mu$ L de etanol 70% em cada amostra (conservado a -20° C) e tampar com tampas em tiras
5. Agitar a placa por inversão umas dez vezes
6. Centrifugar por 10 minutos a 3 500 rpm
7. Descartar o sobrenadante por inversão da placa com força
8. Colocar a placa invertida na centrifuga e centrifugar por 1 minuto a 200 rcf (300 rpm) para secar as amostras.