



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**Associação dos Polimorfismos em Genes de Interleucinas (*IL1B* -511, *IL1RN*,  
*IL6* -174G e *IL8* -251) com Lesões Gástricas Relacionadas ao *Helicobacter pylori***

**FRANCIVANDI COELHO BARBOSA**

**Fortaleza-CE**

**2012**



**FRANCIVANDI COELHO BARBOSA**

**Associação dos Polimorfismos em Genes de Interleucinas (*IL1B* -511, *IL1RN*,  
*IL6* -174G e *IL8* -251) com Lesões Gástricas Relacionadas ao *Helicobacter pylori***

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Microbiologia Médica  
do Departamento de Patologia e Medicina  
Legal da Universidade Federal do Ceará  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestra em Microbiologia Médica**

**Orientadora: Professora Dr<sup>a</sup>. Sílvia Helena B. Rabenhorst**

**Fortaleza-CE**

**2012**



**FRANCIVANDI COELHO BARBOSA**

**Associação dos Polimorfismos em Genes de Interleucinas (*IL1B* -511, *IL1RN*,  
*IL6* -174G e *IL8* -251) com Lesões Gástricas Relacionadas ao *Helicobacter pylori***

**Banca Examinadora**

A handwritten signature in black ink, reading 'Silvia Helena Barem Rabenhorst', is positioned above a horizontal line.

**Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará – UFC**

A handwritten signature in black ink, reading 'Valdir de Queiroz Balbino', is positioned above a horizontal line.

**Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino**  
**Universidade Federal de Pernambuco – UFPE**

A handwritten signature in black ink, reading 'Raquel Carvalho Montenegro', is positioned above a horizontal line.

**Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro**  
**Universidade Federal do Pará – UFPA**

A handwritten signature in black ink, reading 'Márcia Valéria Pitombeira Ferreira', is positioned above a horizontal line.

**Profa. Dra. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira**  
**Universidade Federal do Ceará – UFC**

**Ao meu pai, à minha mãe e  
a minha família  
pelo apoio, dedicação e  
incentivo,  
Dedico**

## AGRADECIMENTOS

### *Agradeço*

*A Deus, por me guiar, iluminar e amparar em toda minha caminhada. Por todas as bênçãos que me foram destinadas em minha vida;*

*Aos meus pais Vandik Estevam Barbosa e Francisca Coelho Barbosa, por sua imensa dedicação à minha formação pessoal e profissional, pelo amor, carinho e apoio dedicado a mim e a meus irmãos;*

*Aos meus tios Vera Lúcia da Silva Pereira e João Suelo Pereira, por me receberem em sua casa como a uma filha, e por seu carinho e atenção;*

*Aos meus irmãos Vandikson Coelho Barbosa e Vanessa Coelho Barbosa, pelo amor, encorajamento e pelo suporte que me deram nesta caminhada;*

*Aos meus amigos Thamara R. de Melo, Carolina A. Brito, Uduvaldo Arcanjo, Gabriela A. Brito, José Lacerda, Carolina V. O. de Oliveira, Júlia R. F. de Araujo, Dênia A. dos Santos, Everton Q. de Oliveira, pela amizade, pelo incentivo e por sempre acreditarem no meu sucesso profissional;*

*Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica representado pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica dos pós-graduandos;*

*À FUNCAP pelo apoio financeiro;*

*Ao Hospital Universitário Walter Cantídeo, ao Hospital São José e ao Hospital Geral de Fortaleza, por permitir o acesso aos pacientes e ao material necessário para a realização deste estudo;*

*Aos pacientes que participaram deste estudo e seus familiares;*

*Aos médicos endoscopistas que participaram deste estudo;*

*À professora Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, por me receber em seu laboratório, pela orientação e confiança;*

*À professora Ma. Fernanda Capelo Barroso, por todas as análises histológicas das amostras de lesões gástricas;*

*Ao professor Dr. Valdir Balbino, por me receber em seu laboratório durante as análises de dados, por orientar as análises dos dados gerados, e pelo tempo e paciência disponibilizados;*

*Ao doutorando Marcus Cardoso (UFPE), por realizar as análises dos dados gerados para esta dissertação, pela atenção com que me recebeu em Recife, e pela dedicação, paciência para me fazer entender os dados gerados;*

*Aos participantes da banca, pela prontidão em aceitar o convite, pela atenciosa leitura e pela valiosa contribuição;*

*À Dra. Valeska Portela Lima, por sua dedicação, disponibilidade e paciência em passar seus conhecimentos, por ser um exemplo profissional e pessoal a ser seguido, e pela grande amiga que é;*

*À doutoranda Isabelle J. S. de Lima Fernandes, por sua alegria que contagia a todos, por me deixar “explorar” sua capacidade intelectual, por sua amizade e por seu apoio em todos os momentos;*

*À doutoranda Débora Menezes da Costa, por me ajudar sempre que precisei, pelos conselhos nos momentos difíceis e por sua amizade em todas as horas;*

*À doutoranda Markenia K. Santos Alves, por ser exemplo de dedicação a pesquisa, pela amizade; pelos conselhos e por nossas longas e agradáveis conversas;*

*À doutoranda Ana Paula S. do Carmo, por ser além de companheira no projeto, ser amiga;*

*Aos alunos Pedro Bessa, Igor Menezes e Ana Paula, por terem ajudado no desenvolvimento deste estudo;*

*Às mestrandas Erika Hardy e Tatiana Dantas, pelo dinamismo, pelas conversas e pelo incentivo nos momentos difíceis;*

*À doutoranda Eliane Pereira, pela sua dedicação à pesquisa, pelo apoio e pelas deliciosas guloseimas;*

*Ao doutorando Isaac Farias, pelos momentos agradáveis e divertidos proporcionados a todos;*

*Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM), Paulo Vinícius, Emanuele, Leidiane, Ana Patrícia, Denise, Sâmia, Eduardo Henrique, Lia Pinto, Maíra, Gedeane e Apolo, pelo apoio e pela convivência sempre agradável;*

*Às minhas colegas de mestrado, Paloma, Cecília, Juliana, Charlliane e Bruna, por terem compartilhado e minimizado as tensões de várias disciplinas.*

## RESUMO

As Lesões gástricas (LG) se desenvolvem a partir da mucosa normal infectada por *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) e podem progredir para o câncer gástrico (CG) através de um processo com múltiplas etapas. A capacidade de *H.pylori* provocar LG está associada com alguns fatores de sua virulência que, quando expressa entra em contato com as células gástricas promovendo a ativação da resposta imune inata. Esta, por sua vez, ativa a transcrição de citocinas inflamatórias, como as interleucinas (ILs) *IL1B* (-511), *IL1RN* (VTNR), *IL6* (-174) e *IL8* (-251). Tais ILs possuem genes polimórficos que alteram sua expressão e, conseqüentemente, a intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro. Assim, este estudo objetiva verificar a associação entre os polimorfismos de ILs com as LG e o CG na progressão para o CG. Neste estudo foi obtido DNA de 324 pacientes, sendo 118 com CG e 206 com LG pré-malignas (LGPM), coletadas em quatro hospitais de Fortaleza-CE. A identificação dos polimorfismos foi feita por PCR-RFLP e PCR e a detecção de *H. pylori* por PCR. A análise genotípica da comparação entre as LGPM e CG demonstrou uma associação do CG com os genótipos *IL8TT* ( $p=0,0065$ ), *IL6GG* ( $p=0,0012$ ) e *IL1RNLL* ( $p=0,0052$ ). Na associação das ILs 3x3 observou-se que os haplotipos mais inflamatórios estavam associados ao CG; já na análise 4x4 o haplotipo T-T-G-\*2 (*IL1BxIL8xIL6xIL1RN*) foi o mais associado ao CG ( $p=2,89 \times 10^{-5}$ ), sendo este um bom marcador para este tipo de câncer. Na comparação da GCI com o CG observou-se a associação do alelo *IL6G* com o CG ( $p=0,0389$ ). A comparação entre GCA e CG demonstrou que os genótipos *IL8AT* ( $p=0,0016$ ), *IL1RNL\*2* ( $p=0,0049$ ) e *IL6GG* ( $p=0,0004$ ) estão associados ao CG e a análise da associação das ILs 4x4 demonstrou que o haplotipo T-T-G-\*2 (*IL1BxIL8xIL6xIL1RN*) foi associado ao CG ( $p=5,72 \times 10^{-5}$ ), confirmando a importância deste haplotipo como bom marcador para o CG. Na comparação da MI com CG observou-se associação significativa do CG com *IL8AT* ( $p=0,0426$ ) e *IL6GG* ( $p=0,0475$ ). Deste modo, pode-se concluir que, os genótipos mais inflamatórios de todas as ILs estavam associados ao CG e que, de acordo com a análise haplotípica, o haplotipo mais inflamatório (T-T-G-\*2) é um bom marcador para o CG.

**Palavras Chave:** *Helicobacter pylori*, *IL1*, *IL6*, *IL8*, Gastrite Crônica Inativa, Gastrite Crônica Ativa, Metaplasia Intestinal, Câncer Gástrico.

## ABSTRACT

The gastric lesions (GL) develop from normal mucosa infected by *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) and can progress to gastric cancer (GC) through a multi-step process. The ability of *H.pylori* on cause GL is associated with some of their virulence factors that, when expressed, come in to contact with the gastric cells and promoting activation of the innate immune response. This, in turn, activates the transcription of inflammatory cytokines such as interleukins (ILs) *IL1B* (-511), *IL1RN* (VTNR), *IL6* (-174) and *IL8* (-251). Such ILs have polymorphic genes that change expression and, consequently, the intensity of the host inflammatory response. Therefore, this study aims to investigate the association between polymorphisms of ILs with the GC and GL in the progression to the GC. In this study DNA was obtained from 324 patients, 118 with CG and 206 with pre-malignant GL (LGPM), collected in four hospitals in Fortaleza-CE. The identification of polymorphisms was done by PCR-RFLP and PCR analysis and the detection of *H.pylori* by PCR. Genotypic analysis of the comparison between the GC and LGPM demonstrated an association of CG with *IL8TT* genotypes ( $p = 0.0065$ ), *IL6GG* ( $p = 0.0012$ ) and *IL1RNLL* ( $p = 0.0052$ ). The association of ILs 3x3 observed that the most inflammatory haplotypes were associated with GC, while in the analysis the 4x4 T-T-G-\*2 (*IL1BxIL8xIL6xIL1RN*) haplotype was more related to GC ( $p = 2.89 \times 10^{-5}$ ), which is a good marker for this type of cancer. In comparison with the CG and GCI it was observed the association between *IL6G* allele with the GC ( $p = 0.0389$ ). Comparison between GCA and GC showed that *IL8AT* genotypes ( $p = 0.0016$ ), *IL1RNL*\* 2 ( $p = 0.0049$ ) and *IL6GG* ( $p = 0.0004$ ) are associated with the GC, the analysis of the ILs association on 4x4 showed that the T-T-G-\*2 haplotype (*IL1BxIL8xIL6xIL1RN*) was associated with GC ( $p = 5.72 \times 10^{-5}$ ), confirming the importance of this haplotype as a good marker for the GC. In comparison with the MI CG observed a significant association with *IL8AT* CG ( $p = 0.0426$ ) and *IL6GG* ( $p = 0.0475$ ). So, it can be conclude that the genotypes of all inflammatory ILs were associated with the CG and that, according to the haplotype analysis, the most inflammatory haplotype (G-T-T-\*2) is a good marker for the GC.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, *IL1*, *IL6*, *IL8*, Inactive Chronic Gastritis, Chronic Active Gastritis, Intestinal Metaplasia, Gastric Cancer.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
Figura 2 - Polimorfismo do gene <i>vacA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> .....	14
Figura 3 - Ilha de patogenicidade <i>cag</i> , composta por, aproximadamente, 37 Kb e 29 genes .....	16
Figura 4 - Modelo do Sistema de secreção do tipo IV de <i>Helicobacter pylori</i> ...	16
Figura 5 - Fenótipos e variações de CagA, efeitos locais e em toda a célula hospedeira de <i>H. pylori</i> <i>cagA</i> – codifica T4SS e sua proteína efetora, <i>cagA</i> ...	17
Figura 6 - Representação esquemática da Cascata de Correa .....	20
Figura 7 - Diagrama representativo dos Sítios anatômicos do estômago .....	21
Figura 8 - Gastrite crônica não atrófica .....	23
Figura 9 - Escala analógica visual de classificação histopatológica das gastrites .....	24
Figura 10 - Gastrite atrófica .....	25
Figura 11 - Metaplasia intestinal .....	26
Figura 12 - Fotomicrografias de metaplasia intestinal gástrica .....	26
Figura 13 - Histoquímica de metaplasia intestinal gástrica .....	27
Figura 14 - Microfotografias de Displasia .....	29
Figura 15 - Microfotografia de Displasia de baixo grau .....	29
Figura 16 - Classificação histopatológica de Lauren .....	31

## LISTA DE ABREVIACOES

Cag-PAI	Ilha de Patogenicidade <i>cag</i>
CTAB	<i>Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide</i> – Brometo de Cetil Trimetil Amnia
IL	Interleucina
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i> – Agência Internacional de Pesquisa Sobre Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Restrição de Comprimento do Fragmento do Poliorfismos
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Nucleotídeo nico
T4SS	Sistema de Secreção tipo IV
Th1	Células T auxiliaadoras (helper) 1
Th2	Células T auxiliaadoras (helper) 2
TLR	Receptor Toll-like
Treg	Células T reguladoras

## SUMÁRIO

<b>1.0 – Introdução</b> .....	12
<b>1.1 - <i>Helicobacter pylori</i></b> .....	12
1.1.1 Gene <i>vacA</i> - Citotoxina vacuolizante (VacA) .....	14
1.1.2 Ilha de Patogenicidade Cag ( <i>cag</i> -PAI) .....	15
1.1.2.1 Gene <i>cagA</i> - Citotoxina associada ao gene A (CagA) .....	17
1.1.2.2 Gene <i>cagE</i> - Citotoxina associada ao gene E (CagE) .....	18
1.1.2.3 Gene <i>virB11</i> .....	19
1.1.3 Gene <i>flaA</i> .....	19
<b>1.2 - Lesões Gástricas</b> .....	20
1.2.1 - Gastrite .....	21
1.2.1.1 - Gastrite Crônica (GC) .....	22
1.2.1.2 - Gastrite Atrófica (GA).....	24
1.2.2 – Metaplasia Intestinal (MI).....	25
1.2.3 – Displasia.....	28
1.2.4 - Câncer Gástrico (CG) .....	30
<b>1.3 - Resposta Imune do Hospedeiro e Citocinas Inflamatórias</b> .....	31
1.3.1 – Interleucina 1 Beta (IL-1B) .....	32
1.3.2 – Antagonista do Receptor de Interleucina 1 (IL-RN) .....	33
1.3.3 – Interleucina 6 (IL-6) .....	34
1.3.4 – Interleucina 8 (IL-8) .....	34
<b>2.0 - PERGUNTA DE PARTIDA</b> .....	36
<b>3.0 – HIPÓTESES</b> .....	36
<b>4.0 – OBJETIVOS</b> .....	36
<b>4.1 – Geral</b> .....	36
<b>4.2 – Específicos</b> .....	36
<b>5.0 - Referencias Bibliográficas</b> .....	37
<b>6.0 – Resultados e Discussão: Artigo</b> .....	51
<b>ANEXOS</b> .....	69
Anexo – I Parecer do Comitê de ética .....	70
Anexo – II Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	71
Anexo – III Questionário de coleta de dados clinico – epidemiológicos ....	72

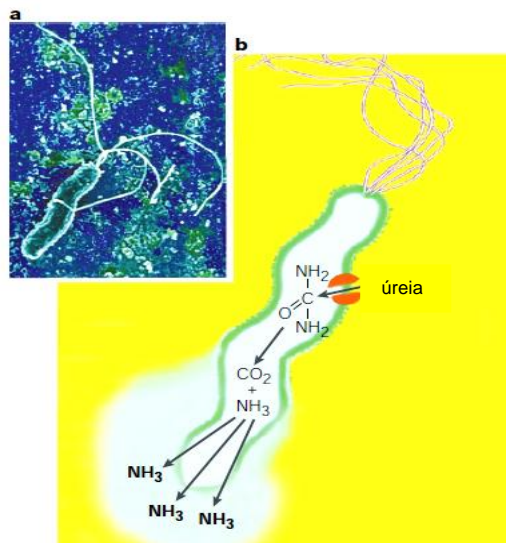
## 1.0- Introdução

Por um longo período do século passado, acreditou-se que as gastrites e úlceras pépticas eram causadas por inúmeros fatores fisiológicos, sendo o mais importante deles a hipersecreção de ácido clorídrico pelas células oxínticas do estômago (BANASCH; SCHMITZ, 2007). Em 1983, Warren e Marshall desmistificaram a ideia de que apenas os fatores fisiológicos eram causadores destas doenças gástricas quando obtiveram um isolado de *Helicobacter pylori* do estômago humano em cultura (WARREN; MARSHALL, 1983). Marshall ingeriu uma suspensão desta cultura bacteriana e provou que o microrganismo isolado provocava gastrite (MARSHALL et al., 1985).

Hoje, sabe-se que a infecção por *H. pylori* está entre as infecções bacterianas mais comuns e é considerada um dos fatores mais importantes na patogênese de várias doenças gastrointestinais, tais como: gastrites, úlcera péptica, metaplasia intestinal e câncer gástrico (SUERBAUM; MICHETTI, 2002; KHALIFA, 2010).

### 1.1 - *Helicobacter pylori*

*H. pylori* é um bacilo gram-negativo, espiralado, microaerófilo, flagelado, produtor das enzimas urease, catalase e oxidase, classificado no domínio Bacteria, Filo Protobacteria, Classe Epsilonproteobacteria, Ordem Campylobacterales, Família Helicobacteraceae e Gênero *Helicobacter* (GOODWIN et al., 1989). Esta bactéria coloniza áreas do estômago e duodeno (WARREN; MARSHALL, 1983) e sobrevive neste ambiente ácido devido à presença da enzima urease. Esta enzima converte a ureia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, em amônia e íons bicarbonato, promovendo, assim, a alcalinização do local, resultando no aumento do pH periplasmático e de seu microambiente (Figura 1). A atuação da enzima urease previne o acúmulo tóxico da ureia no interior de *H. pylori*, protegendo-a dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago (TOMBOLA et al., 2001).



**Figura 1:** *H. pylori* – bacilo espiralado gram-negativo, microaerófilo e flagelado. a) Micrografia eletrônica b) Representação esquemática mostrando a forma, flagelo polar, urease, canal de uréia e a produção de amônia, a qual neutraliza o ambiente ácido em amarelo, o citosol e o ambiente imediatamente ao redor da bactéria (azul). Adaptado de Montecucco e Rappuoli (2001).

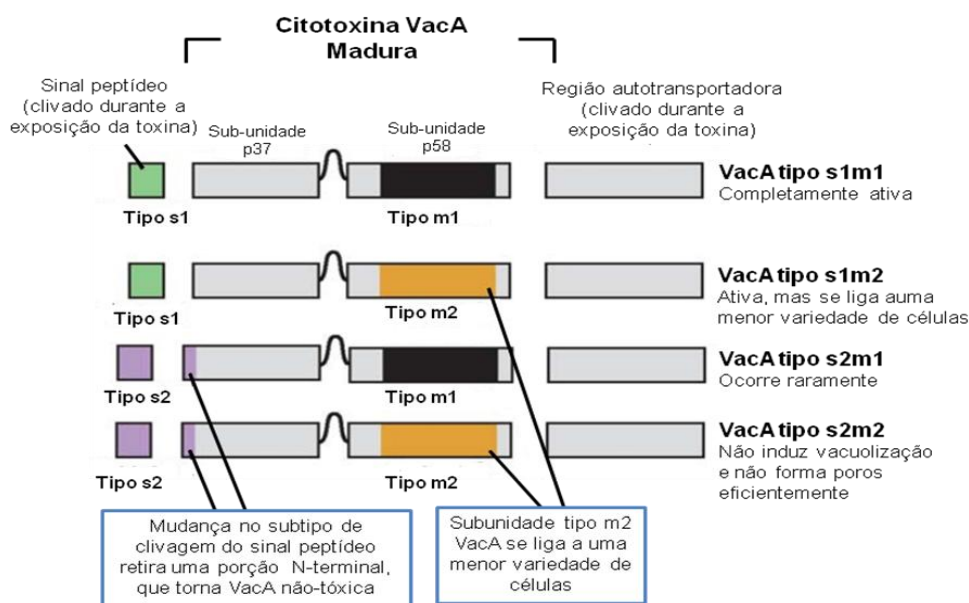
*H. pylori* é classificada pela IARC (International Agency for Research on Cancer – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer) como carcinógeno tipo I (CAVA; COBAS, 2003). O risco de adquirir infecção por *H. pylori* varia de acordo com a idade e condições socioeconômicas. A infecção por esta bactéria é geralmente adquirida na infância, e quando não tratada pode persistir por toda a vida do hospedeiro (PEEK JR; BLASER, 2002). Países em desenvolvimento podem apresentar altas taxas de infecção por *H. pylori* em pessoas de faixas etárias mais jovens (SHERMAN et al., 2002). Embora esta bactéria colonize o estômago de mais da metade da população humana, apenas 20% dessas pessoas desenvolvem úlcera gástrica ou duodenal e menos de 1% desenvolve câncer gástrico (SUERBAUM; MICHETTI, 2002; YUASA, 2003; YAMAOKA et al., 2008).

Sabe-se que a capacidade de *H. pylori* provocar lesão na mucosa gástrica está associada com a expressão de alguns fatores de virulência, de modo que, algumas bactérias podem causar resposta inflamatória mais graves do que outras (DABIRI et al., 2009). Dentre os fatores de virulência desta bactéria que são bem estabelecidos encontram-se os genes *vacA* e *cagA* (ESLICK et al., 1999), comumente utilizados como marcadores da diversidade genética entre as populações (YAMAOKA et al., 2008). Recentes estudos apontam a importância de outros genes de *H. pylori* – como *cagE*,

*virB11* e *flaA* – como importantes fatores de virulência relacionados ao câncer gástrico (ALVES et al., 2010; LIMA et al., 2010).

### 1.1.1 Gene *vacA* - Citotoxina vacuolizante (VacA)

O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori* e possui duas regiões variáveis: a região “s”, que codifica o sinal peptídico, está localizada no final da cadeia 5’ e possui dois alelos *s1* e *s2*; e a região “m” ou meio, que possui as variantes *m1* ou *m2*. A combinação mosaica dos dois tipos de região, “s” e “m”, resulta na produção de quatro variantes da citotoxina VacA (*s1m1*, *s1m2*, *s2m1*, *s2m2*) que determinam o grau de virulência da cepa bacteriana (Figura 2) (ATHERTON et al., 1995; DE FRANCESCO et al., 2009; LIMA, RABENHORST, 2009).



**Figura 2: Polimorfismo do gene *vacA* de *Helicobacter pylori*.** O gene *vacA* possui variações nas regiões sinal (*s1* e *s2*) e média (*m1* e *m2*), normalmente originando dessas combinações três tipos de toxina: *s1m1*, *s1m2* e *s2m2* (o tipo *s2m1* ocorre, porém raramente). Adaptado de Atherton (2006).

Bactérias portadoras do genótipo *vacA s1m1* produzem grande quantidade de citocinas, enquanto as que possuem genótipo *vacA s1m2* produzem esta toxina em menores quantidades. As cepas *vacA s2m2* não têm produção mensurável da toxina e as

cepas *vacA* s2m1 ocorrem raramente e a intensidade de produção da citotoxina não foi mensurada (ATHERTON et al., 1995; CENSINI et al., 1996).

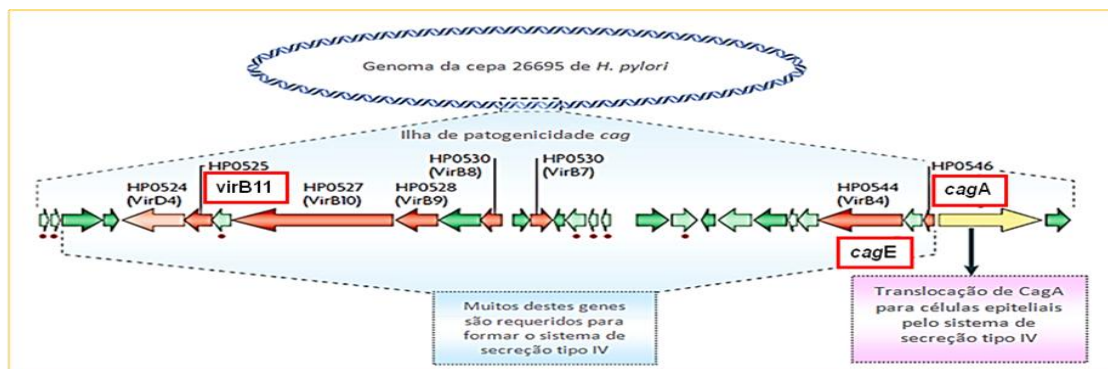
A toxina VacA está associada à capacidade adaptativa da bactéria à mucosa gástrica, e desempenha um importante papel no desenvolvimento da infecção (PASSARO et al., 2002), pois quando liberada no espaço extracelular é internalizada pela célula hospedeira por endocitose. Após a internalização, ocorre a formação de canais que agem como transportadores passivos de compostos produzidos pela bactéria para o interior da célula, bem como de componentes celulares para o meio extracelular (DÍAZ et al., 2005). Além disto, VacA interfere na fagocitose, apresentação de antígenos e pode induzir a célula à apoptose (COVER; BLANKE, 2005).

### 1.1.2 Ilha de Patogenicidade Cag (*cag*-PAI)

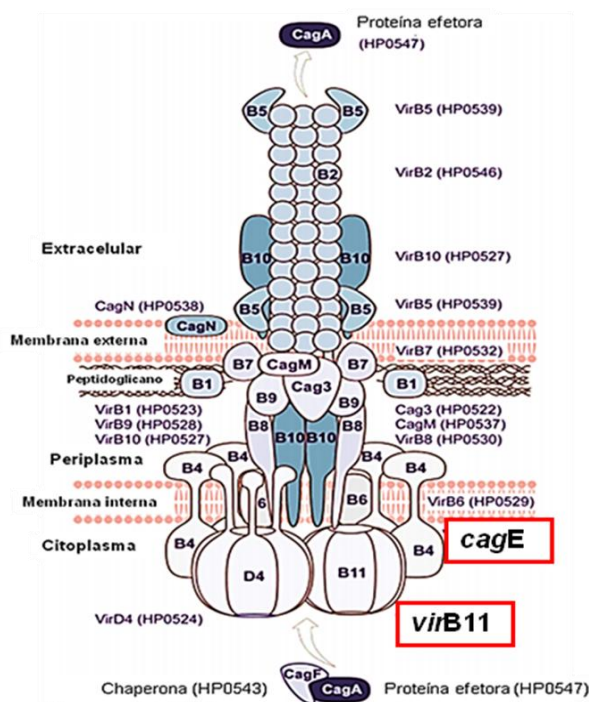
*Cag*-PAI (Figura 3) é um fragmento do genoma bacteriano com aproximadamente 37 Kb que codifica 31 genes e está presente em cerca de 60% a 90% das cepas de *H. pylori*. Alguns dos genes da ilha estão envolvidos nos efeitos lesivos e pró-inflamatórios causados pela bactéria, sendo seis desses genes codificantes de proteínas que compõem o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) (Figura 4) (CENSINI et al., 1996; COVACCI et al., 2000). Este sistema é responsável por injetar moléculas efetoras na célula hospedeira (COVACCI et al., 2000; MÓDENA et al., 2007; LIMA, RABENHORST, 2009). Estudos mostram que cepas de *H. pylori cag*-PAI positivas induzem resposta inflamatória mais grave, aumentando o risco do portador desenvolver úlcera péptica e câncer gástrico (IKENOUE et al., 2001; LADEIRA et al., 2008).

Dentre os genes de *cag*-PAI envolvidos nos efeitos lesivos e pró-inflamatórios causados por *H. pylori* pode-se destacar *cagA*, *cagE* e *virB11*. O gene *cagA* está localizado na porção direita de *cag*-PAI e codifica uma proteína denominada CagA que é considerada altamente imunogênica (PARSONNET et al., 1997). Alguns estudos mostram que as cepas de *H. pylori cagA* positivas possuem um risco maior de desenvolver gastrite crônica e câncer gástrico (BLASER, BERG, 2001; SHIBATA et al., 2002). Também localizado na porção direita de *cag*-PAI, *cagE* codifica uma proteína transmembrana que tem função ATPase, constitui o T4SS e é responsável pela indução da secreção de interleucina 8 pelas células gástricas (TUMMURU et al., 1995).

Localizado na porção esquerda de *cag*-PAI, *virB11* codifica uma proteína constituinte do T4SS que tem função ATPase sendo esta proteína essencial para a translocação de CagA (FISCHER et al., 2001; FRONZES et al., 2009).



**Figura 3: Ilha de patogenicidade *cag*, composta por, aproximadamente, 37 Kb e 29 genes.** As proteínas codificadas pelos genes da ilha estão envolvidas em dois processos principais: a indução da produção de interleucina-8 (IL-8) pelas células epiteliais gástrica e translocação da CagA da bactéria para o interior da célula do hospedeiro. Todos os genes representados pelas setas em tons escuros de vermelho e verde indicam genes que são essenciais para a indução de IL-8; os tons mais claros de vermelho e verde indicam os genes que não estão envolvidos neste processo. As setas marcadas com ponto vermelho indicam os genes que não são necessários para a translocação de CagA, os genes não marcados são essenciais para a translocação. Modificado de Suerbaum e Josenhans (2007).



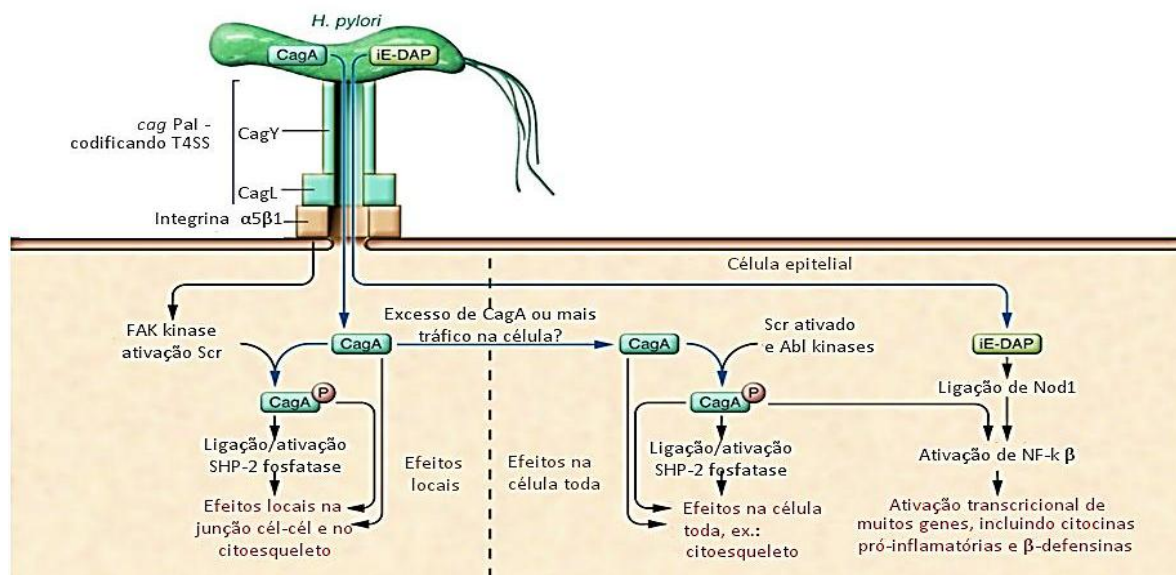
**Figura 4: Modelo do Sistema de secreção do tipo IV de *Helicobacter pylori*.** Os componentes do sistema de secreção codificados por *cag*-PAI estão demonstrados em cinza. Adaptado de Olbermann et al. (2010).



### 1.1.2.1 Gene *cagA* - Citotoxina associada ao gene A (CagA)

O gene *cagA* está localizado no lado direito de *cag*-PAI e é considerado um marcador desta ilha. Este gene codifica uma proteína de 121 – 145KDa, altamente imunogênica que apresenta o mesmo nome do gene, CagA (PARSONNET et al., 1997). Esta proteína é injetada no interior da célula epitelial gástrica pelo T4SS (COVACCI; RAPPUOLI, 2000).

O principal fator que identificou a proteína CagA como fator de virulência foi o fato desta proteína ter sua tirosina fosforilada pelas cinases no interior da célula hospedeira (COVACCI; RAPPUOLI, 2000). Conhecidamente, as cinases responsáveis por esta fosforilação são oncoproteínas (BACKERT et al, 2000). Após a fosforilação CagA interrompe a sinalização celular e provoca diversas alterações. Uma delas ocorre no citoesqueleto, pela destruição da arquitetura normal da célula epitelial gástrica, resultando no fenótipo denominado *hummingbird* (Beija-flor). Além disto, CagA fosforilada em excesso pode ativar o fator nuclear-kB (NF-kB) e causar outros efeitos na célula hospedeira (Figura 5) (HIGASHI et al., 2002; COVACCI, RAPPUOLI, 2003; REYES-LEON et al., 2007, ATHERTON, 2009).



**Figura 5: Fenótipos e variações de CagA, efeitos locais e em toda a célula hospedeira de *H. pylori***  
*cagA* – codifica T4SS e sua proteína efetora, *cagA*. *H. pylori*, com *cag*-PAI intacta, codifica o T4SS que injeta CagA no interior da célula hospedeira. Cinases ativadas fosforilam CagA em resíduos de tirosina específicos, que ativa domínio homólogo Src 2- contendo tirosina fosfato 2 (SHP-2) e sinalizadores locais. Além disso, CagA fosforila a si mesmo e pode ativar NF-kB e ter outros efeitos de

celulares. As setas azuis indicam componentes de *H. pylori*, setas pretas indicam componentes das células epiteliais, e o texto em vermelho indica efeitos celulares. Modificado de Atherton (2009).

As cepas *cagA* positivas tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão das citocinas, tais como IL-1B e IL-8, e estão associadas a um maior grau de infiltração de neutrófilos (BLASER, BERG, 2001; CENSINI et al., 1996; LAMARQUE, PEEK, 2003). Estudos demonstram que as cepas de *H. pylori cagA* positivas aumentam significativamente o risco do portador desenvolver gastrite crônica e câncer gástrico (BLASER, BERG, 2001; CENSINI et al., 1996; LAMARQUE, PEEK, 2003; SHIBATA et al, 2002).

#### **1.1.2.2 Gene *cagE* - Citotoxina associada ao gene E (CagE)**

O gene *cagE* é um dos seis genes de *cag*-PAI que codificam o T4SS. Este gene está localizado ao lado direito de *cag*-PAI próximo à região promotora de *cagA* e está retido de forma consistente com esta região. Apesar de *cagE* ser arranjado com menos frequência que *cagA* ele pode ser usado como um método de rastreamento da estrutura de *cag*-PAI (KAUSER et al., 2004; YÁNEZ et al., 2009), pois análises realizadas em cepas de pacientes japoneses e espanhóis demonstraram que *cagE* estava conservado em todas as cepas de *H. pylori* estudadas (IKENOUE et al., 2001; KAUSER et al., 2004). Além disto, alguns estudos consideram *cagE* um melhor marcador de *cag*-PAI, devido a sua localização (MAEDA et al., 1999; IKENOUE et al., 2001; KAUSER et al., 2004; YÁNES et al., 2009).

Este gene codifica uma proteína de mesmo nome CagE, que é responsável pela indução de rearranjos no citoesqueleto das células gástricas, ativação de NF- $\kappa$ B e indução de secreção da interleucina-8 (IL-8) (TOMASINI et al., 2003; YAMAZAKI et al., 2005). O estudo de Módena et al. (2007), demonstrou que *cagE* está associado com a presença de úlcera péptica, enquanto o de Lima et al. (2010) observou a associação deste gene com o câncer gástrico. Estes fatos demonstram a importância de *cagE* na patogenicidade de *H. pylori*.

### 1.1.2.3 Gene *virB11*

Localizado na metade esquerda de *cag*-PAI, *virB11* é mais um dos genes de *cag*-PAI que constituem o T4SS. Assim como os outros genes de *cag*-PAI supracitados, codifica uma proteína de mesmo nome. A proteína VirB11 tem estrutura em forma de anel composto de seis unidades monoméricas, pertence a família das ATPases associadas aos sistemas secretores de macromoléculas utilizados por patógenos para injetar complexos proteicos no interior das células hospedeiras, quando ocorre um contato direto com as mesmas (KRAUSE et al., 2000; KERSULYTE et al., 2003).

Estudos fortalecem a hipótese de que as VirB11 ATPases direcionam a montagem da maquinaria do T4SS e dirigem a passagem de 23 substratos através do envelope bacteriano para o interior da célula gástrica (CHRISTIE, CASCALES, 2003; CHRISTIE et al., 2005). O estudo de Lima et al. (2010) demonstrou que *virB11* está associado com o câncer gástrico e concluiu que este gene é um importante fator de virulência na patogenicidade de *H. pylori*.

### 1.1.3 Gene *flaA*

*H. pylori* é uma bactéria flagelada que possui uma porção de cerca de cinco flagelos embainhados localizados em um dos polos da bactéria. Os flagelos desta bactéria são constituídos por flagelinas, FlaA e FlaB, codificadas pelos genes *flaA* e *flaB*, respectivamente. A principal proteína constituinte do filamento flagelar de *H. pylori* é a flagelina FlaA, já a flagelina FlaB, que está em menor quantidade, localiza-se na base do flagelo, enquanto a mais abundante, FlaA, encontra-se nas regiões periféricas (KOSTRZYNSKA et al., 1991; SUERBAUM, 1995).

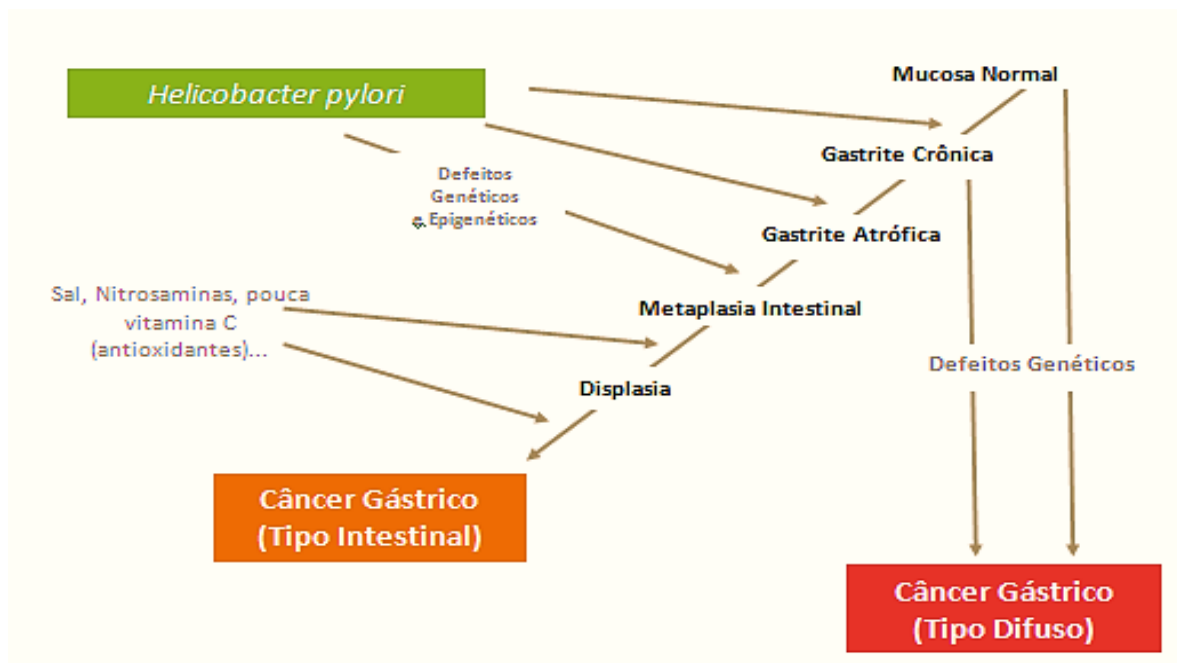
Douillard et al. (2008), utilizando modelo animal, demonstraram que cepas de *H. pylori* com flagelos mutantes são menos virulentas do que cepas do tipo selvagem, indicando que os flagelos são cruciais para o processo de infecção desses patógenos. Já Sozzi et al. (2005) e Alves et al. (2010), descrevem que os flagelos são um dos responsáveis pela colonização bem sucedida de *H. pylori* em seu habitat hostil. Além disso, as imunoglobulinas humanas são muitas vezes dirigidas contra proteínas do

flagelo de *H. pylori* (OTTEMANN; LOWENTHAL 2002). Desta forma, infere-se que os flagelos são importantes fatores de virulência de *H. pylori*.

## 1.2 - Lesões Gástricas Relacionadas ao *H. pylori*

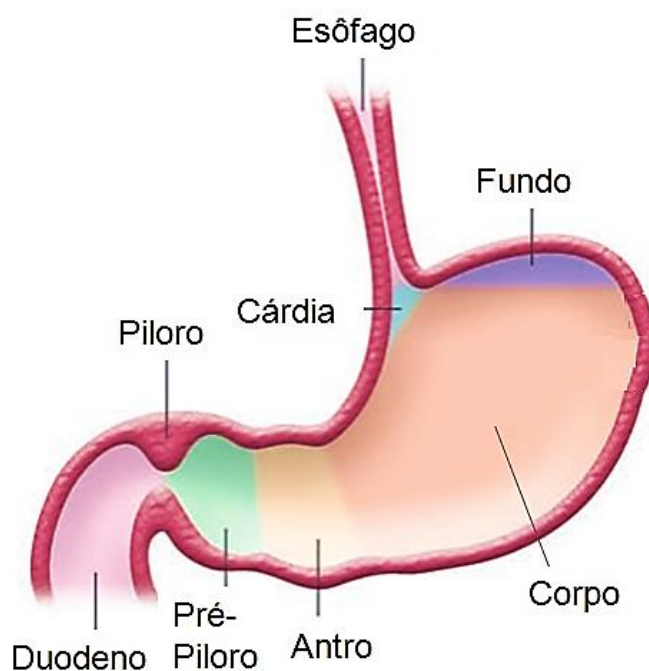
Desde que foi descoberta, a infecção por *H. pylori* tem sido associada com a ocorrência de várias doenças gastroduodenais (DUNN et al., 1997). No entanto, apesar da alta incidência desta infecção em todo o mundo, cerca de 80% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos e somente uma minoria desenvolve úlcera péptica, gastrite atrófica ou doenças gástricas malignas (GIUDICEG et al., 2006; SUERBAUM; MICHETTI, 2002; KHALIFA, 2010).

As lesões gástricas associadas a *H. pylori* podem progredir para o câncer gástrico através de um processo com múltiplas etapas proposto por Correa (1992), sendo distintas as vias que levam à formação dos tumores gástricos dos tipos intestinal e difuso (Figura 6) (WERNER, 2001; MULLER et al., 2007).



**Figura 6: Representação esquemática da Cascata de Correa.** Modelo sequencial de alterações, com a progressão a partir da mucosa normal, evoluindo para gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e, por fim, câncer gástrico do tipo intestinal. Adaptado de Correa (1992).

As lesões gástricas podem estar localizadas em qualquer parte do estômago, que se divide em cinco regiões anatômicas (Figura 7): cárdia, porção cônica e estreita situada imediatamente após a união gástricosofágica; fundo gástrico, região em forma de cúpula do estômago proximal que se estende no sentido superior lateral à região da cárdia; corpo gástrico, que compreende o restante do estômago proximal que vai até a incisura angular; antro gástrico; e região pré-pilórica, inicia-se na incisura angular e termina no duodeno, sendo separado deste pelo piloro (KUMAR et al., 2011).



**Figura 7: Diagrama representativo dos sítios anatômicos do estômago.** Adaptado de Fox e Wang (2007).

### 1.2.1 - Gastrite Associadas ao *H. pylori*

Denomina-se de gastrite a inflamação aguda ou crônica da mucosa gástrica. A fase aguda da gastrite é de curta duração e a resposta imune elimina a infecção, mas não a colonização de *H. pylori*. Desta forma, em algumas semanas, ocorre a produção gradual de células inflamatórias crônicas (ATHERTON et al, 1997), levando a gastrite aguda à progressão para uma gastrite crônica.

### 1.2.1.1 – Gastrite Crônica (GC)

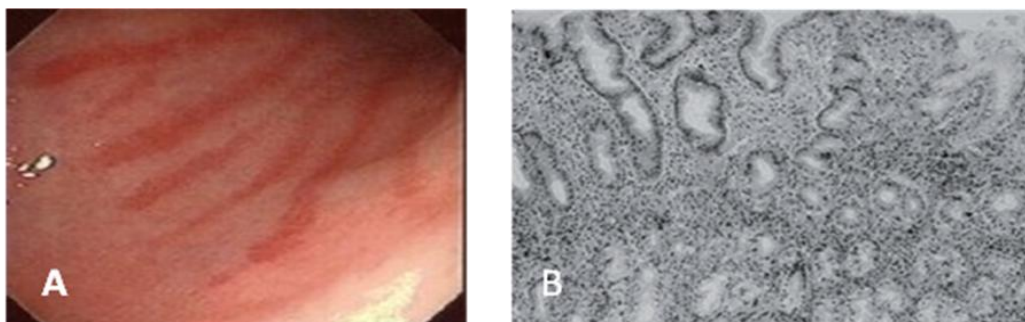
Entre as doenças causadas por *H. pylori*, a gastrite crônica é a enfermidade mais comum e possui uma larga e uniforme distribuição mundial. No Brasil, estudos demonstram que a ocorrência da infecção por *H. pylori* varia de 70 a 97% (CABRAL et al., 2006; LADEIRA et al., 2008; MOTTA et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; ARRUDA et al., 2009; BARTCHEWSKY et al., 2010; KAGUE et al., 2010; MEINE et al., 2011).

A gastrite crônica é considerada uma seqüela inespecífica a uma agressão difusa, multifatorial e de longa duração à mucosa gástrica. Essa lesão exibe variações de intensidade e topografia na dependência do fator etiológico, do tempo e da evolução do processo (Figura 8). A gastrite crônica progride em intensidade, desde uma inflamação superficial até estágios de inflamação mais profunda, com atrofia da mucosa e graus crescentes de metaplasia intestinal (DIXON et al., 1996; STOLTE; MEINING, 2001; MAGALHÃES et al., 2005). Na Tabela 1, pode-se observar a classificação da gastrite crônica com base na topografia, morfologia e etiologia.

**Tabela 1: Classificação de gastrite crônica com base na morfologia, topografia e etiologia.** Modificado de Dixon et al. (1996).

<b>Tipos de gastrites</b>	<b>Fatores etiológicos</b>	<b>Sinônimos de gastrites</b>
<b>Não atrófica</b>	<i>Helicobacter pylori</i> Outros fatores	Superficial, Gastrite antral difusa, Gastrite crônica antral, Intersticial-folicular, Hipersecretória Tipo B*
<b>Atrófica Auto imune</b>	Autoimunidade.	Tipo A*, Difusa do corpo, Associada a anemia, Perniciosa
<b>Atrofia multifocal</b>	<i>Helicobacter pylori</i> .	Tipo B*; tipo AB* Ambiental, Metaplásica
<b>Formas especiais Químicas</b>	Irritação química, Bile, AINES (Antinflamatórios não esteroidais), Outros agentes.	Reativa, Refluxo, AINES Tipo C*
<b>Radiação Linfocítica</b>	Injúria por radiação, Idiopática ? mecanismos imunes.	Varioliforme (endoscópica), Associada a doença celíaca
<b>Não infecciosas Granulomatosas</b>	Doença de Crohn, Sarcoidose, Granuloma de Wegener e outras vasculites, Substâncias estranhas, Idiopática.	Granulomatosa isolada
<b>Eosinofílica</b>	Sensibilidade alimentar Outros alérgenos.	Alérgica
<b>Outras gastrites infecciosas</b>	Bactérias (outras exceto <i>H. pylori</i> ) Vírus, Fungos, Parasitas.	Flegmonosa

\*alfabeto de designações de gastrites que foi abandonado no sistema de Sydney.

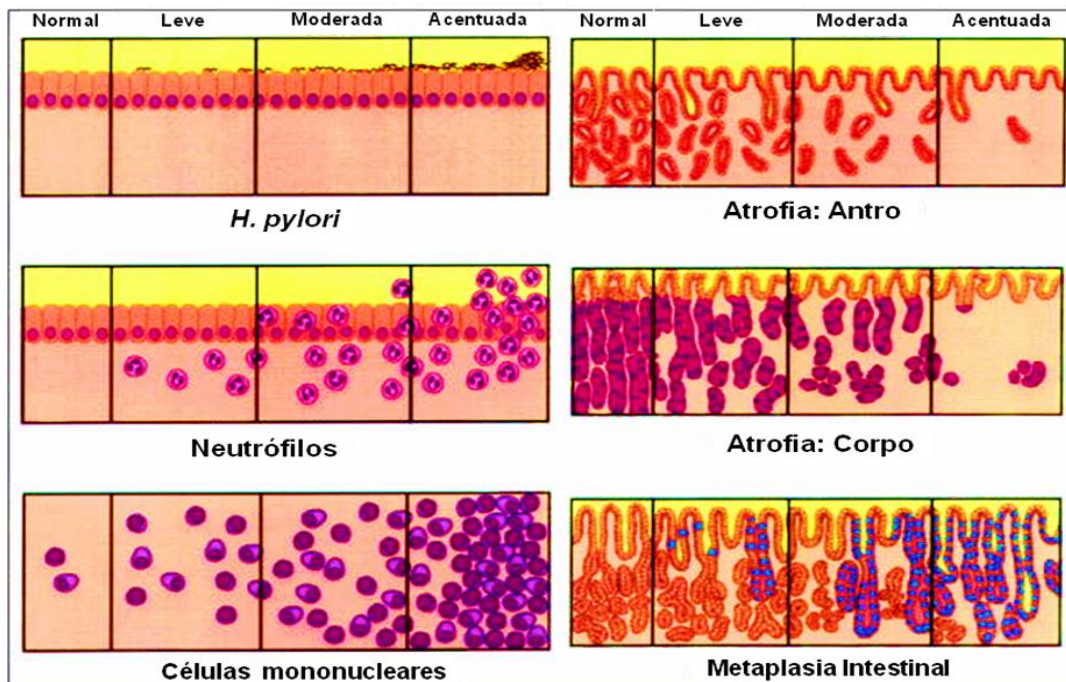


**Figura 8: Gastrite crônica não atrófica.** Em A observa-se o aspecto endoscópico da gastrite crônica não atrófica e em B, microfotografia de gastrite crônica não atrófica corada por Hematixilina-Eosina (H-E) com aumento de 200 vezes. Fontes: A - [www.endoscopicurso.com.br/imagens/fotografias](http://www.endoscopicurso.com.br/imagens/fotografias); B - Muller et al. (2007).

Na gastrite por *H. pylori*, encontra-se um infiltrado celular que contém efetores da resposta imune, incluindo linfócitos T CD4 e CD8, linfócitos B, plasmócitos, monócitos, mastócitos e eosinófilos (DIXON et al., 1996). A presença de exsudação de neutrófilos dá a característica de atividade à gastrite crônica, podendo, assim, ser dividida em dois tipos: gastrite crônica ativa e gastrite crônica inativa.

A classificação histopatológica das gastrites leva em consideração o grau de infiltração de neutrófilos, sendo categorizadas em discreta, moderada e intensa. Uma escala visual analógica (Figura 9) foi estabelecida por Sydney (Sistema de Sydney) a fim de criar uma padronização dos laudos histopatológicos. O valor real da qualificação da gastrite crônica reside na relação entre padrões de inflamação, atrofia e suas associações com a evolução das doenças gástricas. Estes padrões podem ser suficientes como preditivos do risco de úlcera péptica ou câncer gástrico (RUGGE; GENTA, 2004).



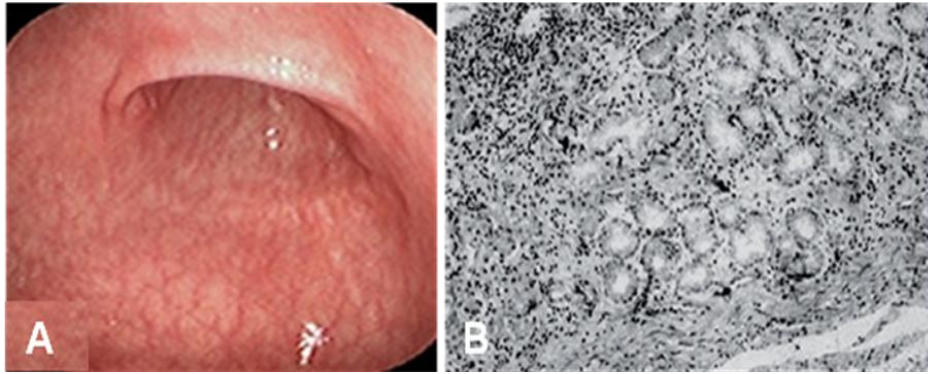


**Figura 9:** Escala analógica visual de classificação histopatológica das gastrites. Representação esquemática da amplitude de cada característica da mucosa gástrica, divididas em normal, graduação leve, moderada e acentuada, para as variáveis: *H. pylori*, atrofia corpo e antro, infiltração de neutrófilos, células mononucleares e presença de metaplasia intestinal. Adaptado de Dixon et al. (1996).

### 1.2.1.2 – Gastrite Atrófica (GA)

Gastrite atrófica é um processo histopatológico caracterizado por inflamação crônica da mucosa gástrica com perda de células glandulares gástricas e substituição desta por epitélio intestinal, glândulas pilóricas e tecido fibroso. A atrofia da mucosa gástrica é o ponto final de processos crônicos contra células glandulares gástricas, tais como gastrite crônica associada à *H. pylori*. A atrofia da mucosa gástrica leva ao afinamento da mesma, causando danos graves, que podem ser seguidos de erosões ou ulcerações da mucosa com destruição da camada glandular (Figura 10) (LAUWERS; SRIVASTAVA, 2007).





**Figura 10: Gastrite atrofica.** Em A, observa-se aspecto endoscópico da gastrite atrofica e, em B, microfotografia de gastrite atrofica corada por H-E com aumento de 200x. Fontes: A - [www.endoscopicurso.com.br/imagens/fotografias](http://www.endoscopicurso.com.br/imagens/fotografias); B - Muller et al. (2007).

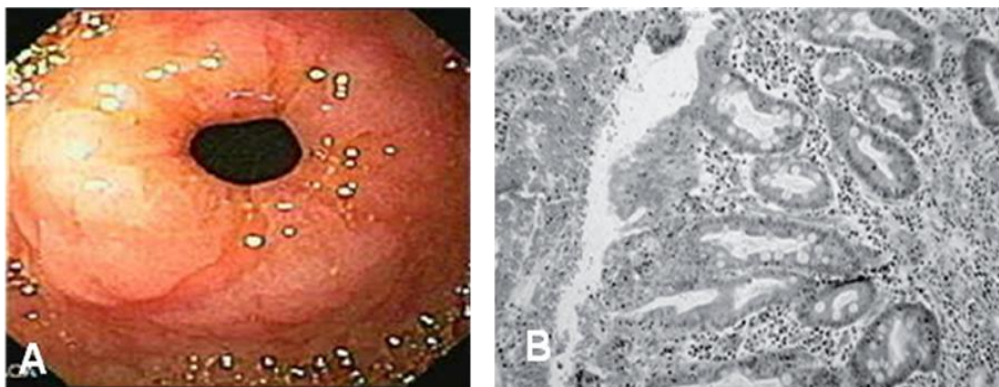
No câncer gástrico do tipo intestinal, encontra-se atrofia da mucosa mesmo na ausência de metaplasia, sugerindo que a atrofia é um indicador do risco deste tipo de câncer. No entanto, a regressão da atrofia após o tratamento de *H. pylori* não elimina por completo o risco de desenvolver câncer (EL-ZIMAITY, 2006).

A atrofia da mucosa do corpo gástrico está ligada à perda da secreção ácida e ao desenvolvimento de metaplasia, desta forma, há um risco aumentado da progressão para câncer gástrico (DIXON et al., 1996; LAUWERS; SRIVASTAVA, 2007). As gastrites atroficas têm sido associadas à positividade da infecção por *H. pylori* de 66% a 73% dos casos (HAZIRI et al., 2010; HISHIDA et al., 2010).

### 1.2.2 – Metaplasia Intestinal (MI)

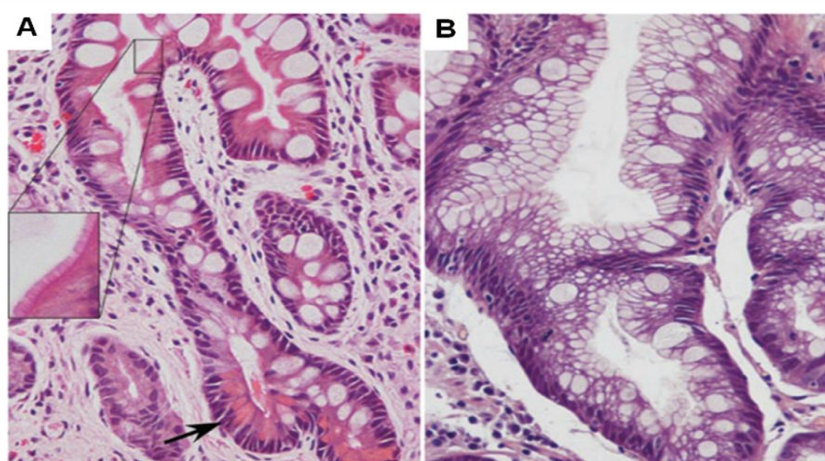
Metaplasia Intestinal (Figura 11) é, por definição, a substituição da mucosa gástrica por epitélio que se assemelha à mucosa do intestino delgado. A MI resulta da proliferação de células-tronco gástricas desviadas do processo de multiplicação de células específicas do estômago para produzirem células do intestino delgado, tais como células de absorção, caliciformes e Paneth (LEUNG; SUNG, 2002). Este processo ocorre, geralmente, pela irritação persistente da mucosa que pode ser provocada por: infecção por *H. pylori*; refluxo biliar crônico; ou induzida, experimentalmente, por irradiação e agentes mutagênicos (RODRIGUES et al., 2001). A MI é frequentemente identificada em biópsias gástricas distais, especialmente em populações de alto risco

para câncer gástrico, como as do leste da Ásia, da Europa Oriental e da América Andina (CORREA et al., 2010).



**Figura 11: Metaplasia intestinal.** Em A, observa-se o aspecto endoscópico da metaplasia intestinal e, em B, o aspecto microfotografia de metaplasia intestinal corada por H-E co aumento de 200 vezes. Adaptadas de: A - [www.endoscopiacurso.com.br/imagens/fotografias](http://www.endoscopiacurso.com.br/imagens/fotografias); B - Muller et al. (2007).

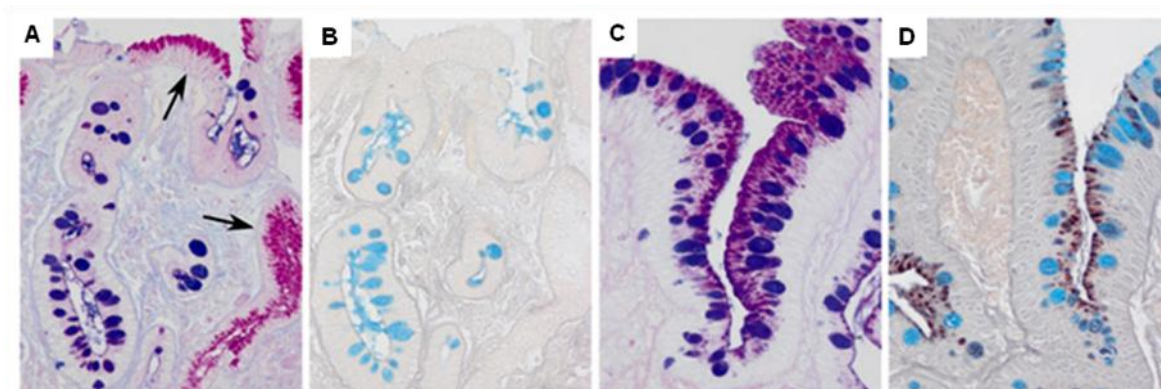
Existem vários sistemas de classificação que são utilizados para categorizar a MI. Dentre os dois mais utilizados são o que baseia sua classificação na presença de enzimas digestivas intestinais, dividindo as MI em completa e incompleta (Figura 12); e aquele que combina as características morfológicas descritas para os tipos completas e incompletas com a análise dos tipos de mucinas expressas, subdividindo as MI em tipos I, II e III (RODRIGUES et al., 2001; CORREA et al., 2010).



**Figura 12: Fotomicrografias de metaplasia intestinal gástrica.** Observa-se em A MI completa, com células caliciformes bem definidas alternadas com enterócitos eosinofílicos exibindo borda bem desenvolvida (no detalhe) e células Paneth (seta). Em B temos MI incompleta, mostrando várias

gotas de mucina intracitoplasmática de vários tamanhos e formas, e ausência de bordas em escova (Coloração H-E, aumento de 400x, no detalhe aumento de 1.000x). Traduzido de Correa et al. (2010).

Na MI do tipo I (Figura 13 A e B), observa-se a presença de células absorptivas, células de Paneth e de células caliciformes produtoras de sialomucinas. Neste tipo ocorre uma substituição completa do epitélio gástrico por epitélio intestinal, correspondendo a MI completa. O tipo II se caracteriza pela existência de células caliciformes, que secretam tanto sialo quanto sulfomucinas; células colunares, secretoras de mucinas neutras e, em menor quantidade, sialomucinas; e ausência de células de Paneth. No tipo III (Figura 13 C e D), encontram-se células colunares secretando sulfomucinas e uma maior quantidade de sialomucinas, também se observa uma maior quantidade de atipias celulares. Os tipos II e III, considerados formas menos diferenciadas da MI, caracterizam a MI incompleta (Tabela 1) (LEUNG; SUNG, 2002; LAUWERS; SRIVASTAVA, 2007; GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ; WRIGHT, 2008; CORREA et al., 2010).



**Figura 13: Histoquímica de metaplasia intestinal gástrica.** A e C – coloração azul de ácido periódico de Schiff-Alcian. Mucinas neutras são coradas de magenta (setas mostram epitélio normal), e mucinas ácidas são coradas em azul (ou roxo, quando combinado com o neutro). B e D técnica Alcian azul de alta-ferro diamina diferencia mucinas ácidas. Sialomucinas estão marcadas em azul, e sulfomucinas em castanhos. As figuras A e B mostram MI completa (tipo I) com presença de sialomucinas nas células caliciformes, e ausência de sulfomucinas. Já as figuras C e D demonstram MI incompleto (tipo III) com sialomucinas nas células caliciformes e uma mistura de neutro e sulfomucinas em células colunares. (Aumento original, 400x). Traduzido de Correa et al. (2010).

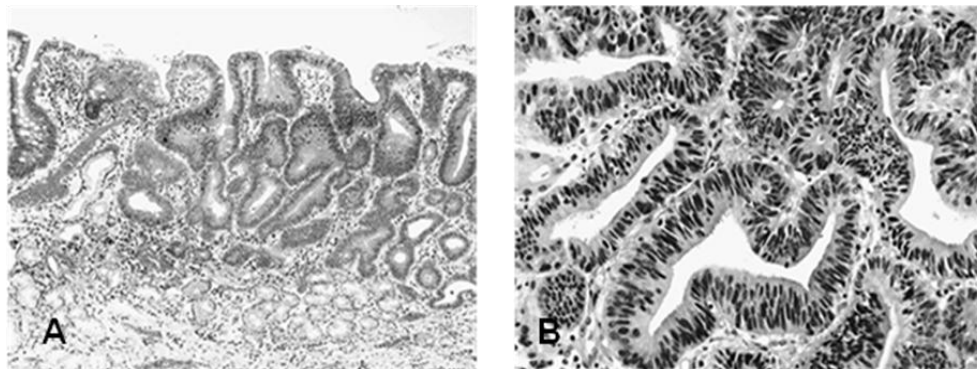
**Tabela 1: Características citológicas encontradas nas metaplasias intestinais**

	<b>Metaplasia intestinal completa (tipo I)</b>	<b>Metaplasia intestinal incompleta (tipo II e III)</b>
<b>Células calciformes</b>	Presente	Presente
<b>Células absortivas</b>	Presente (c/ bordas em escova)	Ausência
<b>Células Paneth</b>	Presente	Poucas ou ausência
<b>Secreção de sialomucinas</b>	Sim	Sim pequena quantidade
<b>Secreção de sulfomucinas</b>	Raramente	Sim
<b>Células colunares</b>	Presente	Presente

Adaptado de Rodrigues et al. (2001); Lauwers e Srivastava (2007).

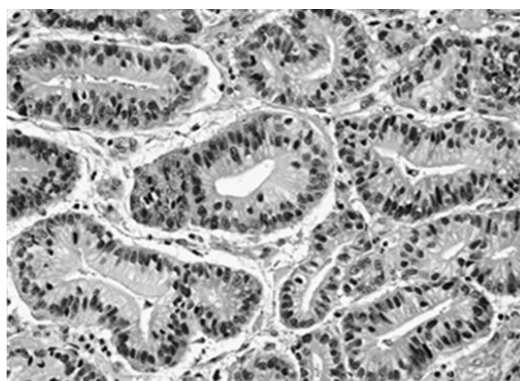
### 1.2.3 – Displasia

Numa sequência bem definida da carcinogênese a displasia epitelial gástrica precede o desenvolvimento da maioria dos adenocarcinomas. A displasia epitelial gástrica é uma proliferação do epitélio neoplásico, caracterizada por variação na arquitetura celular, como distorção e aglomeração glandular, e anormalidades celulares, tais como alteração nuclear, alteração da relação núcleo-citoplasmática, hiper cromia e número de figuras de mitose. A displasia epitelial gástrica, normalmente, é um achado morfológico que pode ser identificado em cortes histológicos de rotina e não necessita de colorações especiais. Baseado no padrão da arquitetura celular, a displasia é classificada em displasia adenomatosa, também conhecida como displasia intestinal ou tipo I (Figuras 10 A e B). A displasia pode, ainda, obedecer a uma subclassificação, de acordo com a hiper cromasia e a pseudoestratificação nuclear em baixo grau e alto grau (LAUWERS, SRIVASTAVA, 2007).



**Figura 14:** Microfotografias de Displasia: A) Displasia de baixo grau, do tipo intestinal (limitada complexidade na arquitetura), B) Displasia de baixo grau, do tipo intestinal (núcleos hiper Cromáticos e pseudo estratificação) (H-E 200x) Adaptado de Lauwers e Srivastava, 2007.

A displasia hiperplásica ou tipo II (Figura 11) é uma variante histológica da displasia menos comum que displasia epitelial gástrica. Esta variante da displasia está mais comumente associada com a denocarcinomas do tipo intestinal pouco diferenciado. A displasia também pode se desenvolver na forma de pólipos gástricos hiperplásicos, particularmente aqueles com mais de 2 cm de tamanho. Vários estudos têm relatado que alterações displásicas ocorrem em 1,8% a 16,4% dos pólipos hiperplásicos (CARNEIRO et al., 1993; HIZAWA et al., 1995). Na displasia tem sido relatada uma positividade da infecção por *H. pylori* de 71% (HAZIRI et al., 2010).



**Figura 15:** Microfotografia de Displasia de baixo grau, do tipo foveolar, formando círculos, núcleo basal, nucléolos inconspícuos, e estratificação mínima, com citoplasma abundante (H-E 200x). Adaptado de Lauwers e Srivastava, 2007.

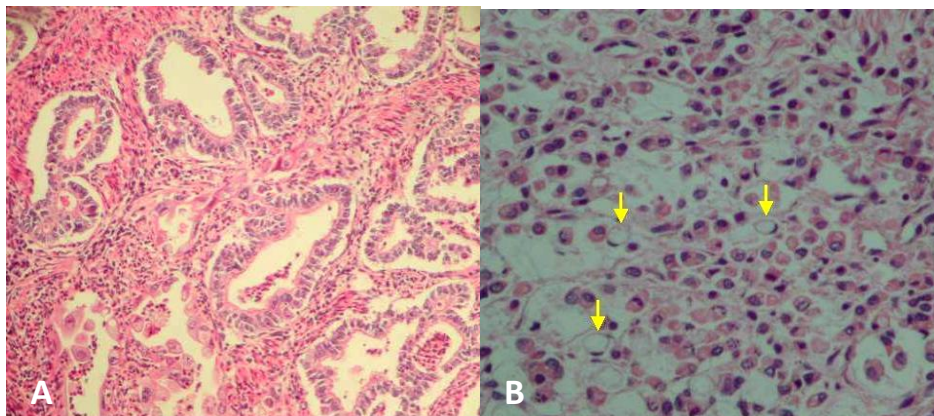


#### 1.2.4 - Câncer Gástrico (CG)

Os tumores gástricos compõem o quarto tipo de câncer mais frequente no mundo, sendo a segunda causa de morte por câncer em ambos os sexos. No entanto, a frequência destes tumores é duas vezes maior em homens que em mulheres (WEN; MOSS, 2009). Na região Nordeste do Brasil o câncer gástrico é o segundo mais frequente entre os homens e o quinto entre as mulheres. Estima-se que em 2012 ocorram 12.670 novos casos de câncer do estômago em homens e 7.420 em mulheres no Brasil (INCA, 2012).

Vários estudos sugerem que os fatores genéticos e ambientais são importantes fatores etiológicos envolvidos na formação do tumor gástrico (CAMARGO et al, 2004; GONZÁLES et al., 2003; NISHINO et al., 2006; PAKSERESHT et al., 2011). Barber et al. (2006) sugerem que os fatores hereditários sejam responsáveis por 5-10% de todos os casos de câncer gástrico. Dentre os fatores ambientais destacam-se: o consumo demasiado de sal, que provoca a destruição da mucosa gástrica gerando inflamação, erosão e degeneração do epitélio (GONZÁLES; LÓPEZ-CARRILO, 2010; PAKSERESHT et al., 2011); o consumo excessivo de álcool (PAKSERESHT et al., 2011; SHIMAZU et al., 2008); tabagismo (GONZÁLES et al., 2003; GONZÁLES; LÓPEZ-CARRILO, 2010); e infecção por *H. pylori*, um dos principais fatores ambientais causadores do câncer gástrico (WEN; MOSS, 2009).

A infecção causada por *H. pylori* está relacionada à carcinogênese de tumores gástricos no subtipo intestinal, como proposto por Correa (1992) (Figura 6). Anatomicamente, os tumores gástricos são localizados nas regiões da cárdia ou não-cárdia. Diferenças entre estes tumores sugerem que são doenças distintas com etiologias diferentes (KONTUREK et al., 2006). Histologicamente, estes tumores são divididos em epitelial e não-epitelial (CORREA et al., 2009). Outra classificação utilizada é a classificação de Lauren (1965), que se utiliza de aspectos histológicos e clínicos para dividir os tumores gástricos nos subtipos intestinal e difuso (Figura 14), os quais diferem entre si pelas características histopatológicas e prognósticas.



**Figura 16: Classificação histopatológica de Lauren.** Adenocarcinoma dos tipos (A) intestinal e (B) difuso. Corados por H-E com aumento de 400x. Fotos cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular da UFC.

Os tumores do subtipo intestinal (Figura 14A) são os mais frequentes, sendo encontrados geralmente em homens e pessoas mais idosas. Estes tumores dependem de fatores ambientais e podem estar associados a lesões gástricas pré-malignas causadas por *H. pylori*, que representam estágios intermediários no desenvolvimento do câncer gástrico. Já os tumores difusos (Figura 14B) geralmente acometem pacientes jovens do sexo feminino, não estão associados a lesões pré-malignas e os fatores hereditários parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento desta neoplasia (YUASA, 2003).

### 1.3 - Resposta Imune do Hospedeiro e Citocinas Inflamatórias

Durante a infecção por *H. pylori*, as células epiteliais gástricas entram em contato com a bactéria e, subsequentemente, com seus diversos fatores de virulência, tais como CagA, VacA, T4SS, lipopolissacarídeos, flagelinas, entre outros (O'KEEFFE; MORAN, 2008). Dentre estes fatores, os lipopolissacarídeos e as flagelinas, iniciam a resposta imune inata através da ligação aos receptores toll-like (TLR) 2, 4 e 5, presentes nas células epiteliais gástricas. No entanto, estes componentes bacterianos provocam uma fraca ativação da resposta mediada por TLR4 e TLR5 (LEE et al, 2003). Outra via envolvida na resposta imune inata à *H. pylori* parece ser mediada pelas proteínas da família Nod, principalmente pela proteína Nod-1, que detecta peptídeos que compõe a

parede celular de *H. pylori*. Tal detecção estimula a sinalização através da ativação de NF- $\kappa$ B, que por sua vez leva a transcrição de vários genes, incluindo citocinas inflamatórias como IL-8 (VIALA et al., 2004).

A interação entre as respostas imunes inata e adaptativa, na infecção por *H. pylori*, se dá pelas células dendríticas (CD). O rompimento da barreira epitelial pela bactéria facilita a interação entre as CD e os antígenos bacterianos. Após a ativação dos TLR, as CD ativam as células T induzindo a resposta Th1 ou Th2/Treg pela produção de IL-12 ou IL-10, respectivamente (PEEK et al., 2010). Acredita-se que a inflamação provocada por *H. pylori* seja causada pela polarização da resposta para o padrão Th1, embora em alguns casos possa, também, ocorrer resposta Th2 (BAMFORD et al., 1998).

Estudos com modelos animais mostraram que as doenças geradas pela infecção por *H. pylori* são dependentes da resposta mediada por células e citocinas do perfil Th1 (SOMMER et al., 2001; STOICOV et al., 2004). Deste modo, uma resposta Th1 descontrolada estaria relacionada a infecções crônicas e ao desenvolvimento de doenças mais graves, embora esta resposta seja a que confere proteção contra a infecção (O'KEEFFE; MORAN, 2008).

Algumas citocinas envolvidas na resposta inflamatória possuem genes polimórficos. Tais polimorfismos alteram a expressão desses genes e, conseqüentemente, a intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro (LIAO et al., 2008).

### **1.3.1 – Interleucina 1 Beta (*IL1B*)**

IL-1B é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e células epiteliais que induz a ativação de linfócitos T e B, bem como a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (YAMAOKA, et al, 1997). Essa IL tem sua regulação elevada pela infecção causada por *H. pylori* e impulsionada pelo aumento da resposta inflamatória (YAMAOKA, et al, 1997; EL-OMAR, 2001).

A característica mais importante da IL-1B, em relação à patogênese de *H. pylori*, parece ser a capacidade de induzir uma potente inibição da secreção de ácido gástrico, com atividade, supostamente, 100 vezes maior do que os inibidores da bomba de



prótons (BEALES; CALAM, 1998). A supressão da secreção de ácido gástrico produzida pelo aumento da produção de IL-1B tem efeitos significativos sobre alterações cancerosas no estômago. Com baixos níveis de ácido gástrico no estômago, toxinas bacterianas e subprodutos da inflamação, que normalmente seriam destruídos, são acumulados e bactérias que comumente encontramos inóspitas, tornam-se capazes de colonizar a mucosa estomacal, levando a um aumento da infecção bacteriana e de seus subprodutos (RAD et al., 2003). Esse processo desencadeia a formação de lesões gástricas mais graves.

A família de IL-1 é um *cluster* que consiste em três genes relacionados: *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*. Três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dialélicos foram encontrados no gene *IL1B* nas posições: -511 (C>T, rs16944), -31 (T>C, rs1143627) e +3954 (C>T, rs1143634) (YUZHALLIN, 2011), porém o SNP mais estudado é o -511 C/T (rs16944), no qual o alelo T está relacionado ao aumento dos níveis de IL-1B na mucosa gástrica (FURUTA et al., 2002). Alguns estudos demonstram associações entre o alelo polimórfico *IL1B* -511T e o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais, metaplasia intestinal e câncer gástrico (YAMAOKA et al., 1997 ; EL-OMAR et al., 2000; HE et al., 2011).

### 1.3.2 – Antagonista do Receptor de Interleucina 1 (*IL1RN*)

IL-1RN é uma proteína anti-inflamatória que modula os efeitos de IL-1B por meio de ligações competitivas ao receptor de IL-1, porém não promove ativação do mesmo (CAMARGO et al., 2006). Nas infecções e inflamações, os níveis de IL-1RN se encontram bastantes elevados no plasma, sendo aproximadamente 100 vezes maiores que os de IL-1B. Acredita-se que a taxa IL-1B/ IL-1RN seja crítica para determinar a gravidade da reação inflamatória (SANTILLA et al., 1998).

O gene *IL1RN* tem uma variação polimórfica penta alélica no número de repetições de uma sequência de 86 pb localizados no intron 2 deste gene. Estas repetições podem gerar um alelo curto com duas repetições (*IL1RN* \*2), ou um alelo longo (*IL1RN* L), contendo de três a seis repetições (KAMANGAR et al., 2006; SANTILLA et al., 1998).

A associação entre o alelo curto de *IL1RN* (*IL1RN* \*2) e as lesões gástricas tem sido amplamente estudada e alguns destes estudos encontraram um aumento no risco do portador deste alelo desenvolver câncer gástrico, gastrite crônica atrófica e gastrite crônica não-atrófica (EL-OMAR et al., 2001; HE et al., 2011).

### 1.3.3 – Interleucina 6 (*IL6*)

IL-6 é uma citocina multifuncional produzida tanto por células imunes – linfócitos, macrófagos e monócitos – quanto por outras células – epiteliais intestinais e endoteliais (SUGUIMOTO et al., 2010). Esta IL pode ter atividade anti-inflamatória, controlando os níveis de citocinas pró-inflamatórias (XING et al., 1998), ou promover inflamação, pela indução da produção de proteínas da fase aguda (GABAY, 2006). Na infecção por *H. pylori*, os níveis plasmáticos de IL-6 se encontram elevados como, por exemplo, nas gastrites e no câncer gástrico (GATTI et al., 2007), e estão associados a um mau prognóstico em casos avançados de câncer gástrico (ASHIZAWA et al., 2005).

O gene *IL6* está localizado no cromossomo 7 (7p21) e os SNPs de sua região promotora são identificados como *IL6* -597, -572, -373 e -174. Destes polimorfismos relatados, somente um parece afetar a transcrição do gene, o -174 G/C (rs1800795), sendo, portanto, o mais estudado (LIAO et al., 2008). Estudos demonstraram que o alelo selvagem -174G está relacionado a um aumento dos níveis de IL-6 (FISHIMA et al., 1998), artrite crônica juvenil (FISHIMAN et al., 1998), aterosclerose (BENNERMO et al., 2004), diabetes resistente a insulina (UNDERWOOD et al., 2012), doenças gastrointestinais (GATTI et al., 2007), entre outras.

### 1.3.4 – Interleucina 8 (*IL8*)

A IL-8 é uma citocina membro da família das quimiocinas Cis-X-Cis (CXC) produzida principalmente por macrófagos. Esta IL é designada como um potente atrator de neutrófilos e linfócitos, atuando na ativação dos mesmos. Além de um forte quimioatrator, IL-8 também induz proliferação celular, migração e angiogênese (ZHANG, et al, 1999). Esta citocina pró-inflamatória é produzida pelas células epiteliais gástricas no decorrer da infecção por *H. pylori*, principalmente nas infecções causadas pelas cepas *cag*-PAI positivas (YAMAOKA et al, 1999; LAMARQUE, PEEK, 2003).

Estudos mostram que o grau da lesão em pacientes infectados por *H. pylori* se torna maior devido aos altos níveis de IL-8, que, por sua atividade quimioatratadora, elevam o infiltrado de neutrófilos na mucosa gástrica (SUGIMOTO et al, 2010; ZHANG, et al, 1999). Além disto, Yamaoka et al. (2001) demonstraram que o nível de IL-8 foi dez vezes maior na mucosa gástrica de pacientes com câncer gástrico do que em pessoas com tecido gástrico normal.

O gene que codifica IL-8 possui três polimorfismos comuns, *IL8* -251 A/T, +396 T/G e +781 C/T. Dentre estes polimorfismos, o alelo T (polimórfico) de *IL8* -251 A/T (rs4073) está relacionado a um aumento da produção de IL-8 e associado ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama (SNOUSSI et al., 2010), de bexiga (LEIBOVICI et al., 2005) , de estômago (LEE et al., 2005) e gastrite atrófica (TAGUSHI et al., 2005).

## 2.0 - PERGUNTA DE PARTIDA

Os polimorfismos das interleucinas *IL1B* -511, *IL1RN*, *IL6* -174 e *IL8* -251 estão associados a lesões gástricas *H. pylori* positivas de diferentes gravidades?

## 3.0 - HIPÓTESES

- ❖ Os polimorfismos das *IL1B* -511C>T, *IL1RN* (VNTR), *IL6* -174G>C e *IL8* -251A>T induzem o aumento da resposta inflamatória, induzindo, assim, o desenvolvimento de lesões gástricas *H. pylori* positivas mais graves.

## 4.0 - OBJETIVOS

### 4.1 - Geral

Verificar a frequência dos polimorfismos de interleucinas de resposta à infecção por *H. pylori* em lesões gástricas de diversas gravidades.

### 4.2 - Específicos

- ❖ Detectar a presença de *Helicobacter pylori* em material coletado de pacientes com lesões gástricas de diferentes gravidades.
- ❖ Estimar a frequência genotípica considerando os polimorfismos das interleucinas *IL1B* -511C>T, *IL1RN* (VNTR), *IL6* -174G>C e *IL8* -251A>T nos pacientes portadores de lesões gástricas de diferentes gravidades.
- ❖ Comparar os polimorfismos estudados, individualmente e em associação, nas diferentes lesões gástricas.

## 5.0 - Referencias Bibliográficas

ALVES, M. K.; LIMA, V. P.; FERRASI, A. C.; RODRIGUES, M. A.; DE MOURA CAMPOS PARDINI, M. I.; RABENHORST, S. H. CDKN2A promoter methylation is related to the tumor location and histological subtype and associated with *Helicobacter pylori* flaA(+) strains in gastric adenocarcinomas. *APMIS*. v.4, n. 118, p.297-307, 2010.

ARRUDA, S. M. B.; FORONES, N. M.; JUCÁ, N. T.; BARROS, K. S. C. Could gastric histology be a useful marker for making decision on *Helicobacter pylori* eradication therapy in patients with dyspepsia? *Arq Gastroenterol*. v. 46, n.3, p. 209-13, 2009.

ASHIZAWA, T.; OKADA, R.; SUZUKI, Y.; TAKAGI, M.; YAMAZAKI, T.; SUMI, T.; AOKI, T.; OHNUMA, S.; AOKI, T. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor. *Gastric Cancer*. v. 8, p. 124–131, 2005.

ATHERTON, J. C, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, v. 270, n. 30, p. 17771-17777, 1995.

ATHERTON, J. C, et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, v. 112, n. 1, p. 92 – 99, 1997.

ATHERTON J C. The Pathogenesis of *Helicobacter pylori* – Induced Gastro-Duodenal Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v.1, p. 63–96, 2006.

ATHERTON, J. C.; BLASER, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* n. 199, p. 2475–2487, 2009.

BAMFORD K. B.; FAN, X.; CROWE, S. E.; LEARY, J. F.; GOURLEY, W. K.; LUTHRA, G. K.; BROOKS, E. G.; GRAHAM, D. Y.; REYES, V. E.; ERNST, P. B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology*. v. 114, p. 482-492, 1998.

BACKERT, S. et al. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 155-164, 2000.

BARBOSA, H. P. M.; MARTINS, L. C.; SANTOS, S. E. B.; DEMACHKI, S.; ASSUMPCÃO, M. B.; ARAGÃO, C. D.; CORVELO, T. C. O. Interleukin-1 and TNF- $\alpha$  polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population. *World J Gastroenterol.* v. 15, n. 12, p. 1465-71, 2009.

BARTCHEWSKY, W. JR.; MARTINI, M. R.; SQUASSONI, A. C.; ALVAREZ, M. C.; LADEIRA, M. S. P.; SALVATORE, D. M. F.; TREVISAN, M. A.; PEDRAZZOLI, J JR; RIBEIRO, M. L. Effects of *Helicobacter pylori* Infection on the Expressions of Bax and Bcl-2 in Patients with Chronic Gastritis and Gastric Cancer. *Dig Dis Sci*, n. 55, p. 111–116, 2010.

BANASCH, M.; SCHMITZ, F. Diagnosis and treatment of gastrinoma in the era of proton pump inhibitors. **Wien Klin Wochenschr**, v.119, n. 19–20, p. 573–578, 2007.

BARBER, M.; FITZGERALD, R. D.; CALDAS, C. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. v. 15, p. 14-20.

BEALES, I. L.; CALAM, J. Interleukyn 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. **Gut**. v. 42, p. 227-234, 1998.

BENNEMOR, M.; HELD, C.; STEMME, S.; ERICSSON, C. G.; SILVEIRA, A.; GREEN, F.; TORNVALL, P. Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implication for a variety of major disease? **Clin Chem**. v. 50, p. 2136-2140, 2004.

BLASER, M. J.; BERG, D. E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J. Clin. Invest.* v.7, n. 107, p. 767-773, 2001.

CABRAL, M. M. D. A.; MENDES, C. M. C.; CASTRO, L. P. F.; CARTELLE, C. T.; GUERRA, J.; QUEIROZ, D. M. M.; Nogueira, A. M. M. F. Apoptosis in *Helicobacter pylori* Gastritis is Related to *cagA* Status. *Helicobacter*, n. 11, p. 469–476, 2006.

CAMARGO, M. C.; YEPEZ, M. C.; CERON, C.; GUERRERO, N.; BRAVO, L. E.; CORREA, P.; FONTHAM, E. T. H. Age at Acquisition of *Helicobacter pylori* Infection: Comparison of Two Areas with Contrasting Risk of Gastric Cancer. **Helicobacter**. v. 9, n. 3, p. 262–270, 2004.

CAMARGO, M. C.; MERA, R.; CORREA, P.; PEEK JR, R. M.; FONTHAM, E. T. H.; GOODMAN, K. J.; PIAZUELO, M. B.; SICINSCHI, L.; ZABALETA, J.; SCHNEIDER, B. G. Interleukin-1 B and Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphisms and Gastric Cancer: A Meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 9, p. 1674-1687, 2006.

CAVA, F.; COBAS, G. Dos décadas de *Helicobacter pylori*. **VacciMonitor**, 1 Año, v. 12, n. 1. Enero-Marzo del, 2003.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; *et al.* *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*.v.25, n. 93, p. 14648–53, 1996.

CHRISTIE, P. J.; ATMAKURI, K.; KRISHNAMOORTHY, V.; JAKUBOWSKI, S.; CASCALES, E. Biogenesis, Architecture and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* n. 59, p. 451-485, 2005.

CHRISTIE, P. J.; CASCALES, E. The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nature Rev Microbiol**. n. 1, p. 137-148, 2003.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - First American Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res**. n. 52, p. 6735-6740, 1992.

CORREA, P.; MACHADO, J. C.; RSTIMÄKI, A. basic aspects of gastic câncer. **Helicobacter**. v. 14, p. 36-40, 2009.

CORREA, P.; PIAZUELO, M. B.; WILSON, K. T. Pathology of Gastric Intestinal Metaplasia: Clinical Implications. **Am J Gastroenterol**. v. 105, n. 3, p. 493–498, 2010.

COVACCI, A.; APPUOLI, R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. **J. Exp. Med**. n. 191, p. 587-592, 2000.

COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori*: after the genomes, back to biology. *J Exp Med.* v. 7, n. 197, p. 807-811, 2003.

COVER, T. L.; BLANKE, S. R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. **Nature Rev. Microbiol.** v. 3, p. 320-332, 2005.

DABIRI H, et al. Distribution of *Helicobacter pylori* *cagA*, *cagE*, *oipA* and *vacA* in different major ethnic groups in Tehran, Iran. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, p. 1380–1386, 2009.

DE FRANCESCO, V.; MARGIOTTA, M.; ZULLO, A.; HASSAN, C.; GIORGIO, F.; ZOTTI, M.; STOPPINO, G.; BASTIANELLI, A.; DITERLIZZI, F.; VERDEROSA, G.; MORINI, S.; PANELLA, C.; IERARDI, E. *Helicobacter pylori vacA* Arrangement and Related Diseases: A retrospective Study Over a Period of 15 years. *Dig Dis Sci.* v. 1, n. 54, p. 97-102, 2009.

DÍAZ M, I.; VALDIVIA, A.; MARTÍNEZ, P.; PALACIOS, J. L.; HARRIS, P.; NOVALES, J.; GARRIDO, E.; VALDERRAMA, D.; SHILLING, C.; KIRBERG, A.; HEBEL, E.; FIERRO, J.; BRAVO, R.; SIEGEL, F.; LEON, G.; KLAPP, G.; VENEGAS, A. *Helicobacter pylori vacA* s1a and s1b alleles from clinical isolates from different regions of Chile show a distinct geographic distribution. *World J Gastroenterol.* v.11, n. 40, p. 6366-6372, 2005.

DIXON, M. F.; PATH, F.R.C.; GENTA, R. M.; YARDLEY, J. H.; CORREA, P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston; 1994. *Am J Surg Pathol.* v. 10, n. 20, p. 1161-1181, 1996.

DUNN B. E.; COHEN H.; BLASER M.J. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* v.10, n.4, p. 720-741, 1997.

EL-OMAR, E.M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v. 404, p. 398–402, 2000.

EL-OMAR E M. The importance of interleukin 1 $\beta$  in *Helicobacter pylori* associated disease. **Gut**, 48: 743–747, 2001.



EL-ZIMAITY, H. M. T. Gastric atrophy, diagnosing and staging. *World J Gastroenterol.* v. 36, n. 12, p. 5757-5762, 2006.

ESLICK, G. D.; LIM, L. L. Y.; BYLES, J. E.; XIA, H. H. X.; TALLEY, N. J. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.*; n.94, p. 2373–2379, 1999.

FISHIMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene of IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest.** v. 102, p. 1369-1372, 1998.

FOX, J. G.; WANG, T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **J. of Clinical Investigation.** v. 117, n. 1, p. 60-69, 2007.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research.** v. 8, p. 1-6.

GATTI, L. L.; BURBANO, R. R.; ZAMBALDI-TUNES, M.; DE-LÁBIO, R. W.; ASSUMPCÃO, P. P.; CARDOSO-SMITH, M. A.; MARQUES-PAYÃO, S. L. Interleukin-6 Polymorphisms, *Helicobacter pylori* Infection in Adult Brazilian Patients with Chronic Gastritis and Gastric Adenocarcinoma. **Archives of Medical Research.** v. 38, p. 551e555, 2007.

GIUDICEG, D.; MICHETTI, P. Inflammation, immunity and vaccine for *Helicobacter pylori*. *Helicob.* n. 1, p. 21-26, 2006.

GONZÁLEZ, C. A.; PERA, AGUDO, G. A.; PALLI, D.; KROGH, V.; VINEIS, P.; TUMINO, R.; PANICO, S.; BERGLUND, G.; SIMÁN, H.; NYRÉN, O.; et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). **Int. J. Cancer:** v. 107, p. 629 – 634, 2003.

GONZÁLEZ, C. A.; LÓPEZ-CARRILLO, L. *Helicobacter pylori*, nutrition and smoking interactions: Their impact in gastric carcinogenesis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology.**; v. 45, p: 6 – 14, 2010.

GOODWIN, C. S. et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae*

comb. nov. Respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 4, p. 397 – 405, 1989.

GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, L.; WRIGHT, N. A. Biology of intestinal metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration. **Dig Liver Dis**. v. 40, p. 510-522, 2008.

HAZIRI, A.; JUNIKU-SHKOLOLLI, A.; GASHI, Z.; BERISHA, D.; HAZIRI, A. *Helicobacter pylori* infection and precancerous lesions of the stomach. *Med Arh*. v. 4, n. 64, p. 248-9, 2010.

HE, B. S.; PAN, Y. Q.; XU, Y. F.; ZHU, C.; QU, L. L.; WANG, S. K. polymorphisms in interleukin-1B (IL-1B) and interleukin receptor antagonist (IL-1RN) genes associated with gastric cancer risk in Chinese population. **Dig. Dis. Sci**. v. 56, p. 2017-2023, 2011.

HIGASHI, H.; TSUTSUMI, R.; FUJITA, A.; YAMAZAKI, S.; ASAKA, M.; AZUMA, T.; HATAKEYAMA, M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor *cagA* is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci*. v. 22, n. 99, p. 14428-33, 2002.

HISHIDA, A.; MATSUO, K.; GOTO, Y.; NAITO, M.; WAKAI, K.; TAJIMA, K.; HAMAJIMA, N. Combined effect of miR-146a rs2910164 G/C polymorphism and Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism on the risk of severe gastric atrophy in Japanese. *Dig Dis Sci*. v. 4, n. 56, p. 1131-7, 2010.

IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. **IARC Monogr Avel Carcinog Risks Hum**. v. 61, p. 1-241, 1994.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas 2012: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2011.

IKENOUE, T.; MAEDA, S.; OGURA, K.; AKANUMA, M.; MITSUNO, Y.; IMAI, Y.; YOSHIDA, H.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. *Clin Diagn Lab Immunol*. v. 1, n. 8, p. 181-186, 2001.

KAGUE, E. ; CRISTIANE, M.; PARDINI, M. I. C. M.; CARVALHO, F.; LEITE, C. V.; PINHEIRO, N. A. Methylation status of CDH1 gene in samples of gastric mucous

from brazilian patients with chronic gastritis infected by *Helicobacter pylori*. *Arq Gastroenterol.* v. 1, n. 47, p. 7-12, 2010.

KAMANGAR, F.; ABNET, C. C.; HUTCHINSON, A. A.; NEWSCHAFFER, C. J.; HELZLSOUER, K.; SHUGART, Y. Y.; PIETINEN, P.; DAWSEY, S. M.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J.; TAYLOR, P. R. Polymorphisms in inflammation-related genes and risk of gastric cancer (Finland). **Cancer Causes Control.** v. 17, p.117-125, 2006.

KANG, J. M.; KIM, N.; LEE, D. H; PARK, J. H.; LEE, M. K.; KIM, J. S.; JUNG, H. C.; SONG, S. The Effects of Genetic Polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced Gastroduodenal Diseases in Korea. **J. Clin Gastroenterol.** v. 43, p. 420–428, 2009.

KAUSER, F.; KHAN, A. A.; HUSSAIN, M. A.; CARROLL, I. M.; AHMAD, N.; TIWARI, S.; SHOUCHE, Y.; DAS, B.; ALAM, M.; ALI, S. M.; HABIBULLAH, C. M.; SIERRA, R.; MEGRAUD, F.; SECHI, L. A.; AHMED, N. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. *J Clin Microbiol.* n. 42, p. 5302–5308, 2004.

KERSULYTE, D.; VELAPATINO, B.; MUKHOPADHYAY, A. K.; CAHUAYME, L.; BUSSALLEU, A.; COMBE, J.; GILMAN, R. H.; BERG, D. E.; Cluster of Type IV Secretion Genes in *Helicobacter pylori*'s Plasticity Zone. *J Bacteriol.* n. ,p. 3764–3772, 2003

KHALIFA, M. M.; SHARAF, R. R.; AZIZ R. K. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen?. **Gut Pathogens,** v. 2, p. 2-38, 2010.

KRAUSE, S.; PANSEGRAU, W.; LURZ, R.; DE LA CRUZ, F.; LANKA, E. Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol.* v. 10, n.182, p. 2761-2770, 2000.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T. gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. **J. Physiol. And Pharmacol.** v. 57, p. 51-65, 2006.

KOSTRZYNSKA, M.; BETTS, J. D.; AUSTIN, J. W.; TRUST, T. J. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. **J. Bacteriol.** v. 173, p. 937–946, 1991.

KUMAR, S.; KUMAR, A.; DIXIT, V. K. Genetic diversity in strains of *Helicobacter pylori* from India and their relatedness to strains from other parts of the world. *Infect Genet Evol.* v. 1, n. 11, p. 242-7, 2011.

LADEIRA M. S. P.; BUENO, R. C. A.; SANTOS, B. F.; PINTO, C. L. S.; PRADO R. P.; SILVEIRA, M. G.; RODRIGUES, M. A. M.; BARTCHEWSKY, W. JR.; PEDRAZZOLI, J. JR.; RIBEIRO, M. L.; SALVADORI, D. M. F. Relationship among Oxidative DNA Damage, Gastric Mucosal Density and the Relevance of *cagA*, *vacA* and *iceA* Genotypes of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*, n. 53, p. 248–255, 2008.

LAMARQUE, D.; PEEK, R. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicob.* n. 1, p. 21-30, 2003.

LAUREN, P. two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Path. Microbiol. Scand.** v. 64, p. 31-49, 1965.

LAUWERS, G. Y.; SRIVASTAVA, A. Gastric Preneoplastic Lesions and Epithelial Dysplasia. *Gastroenterol Clin N Am.* n. 36, p. 813–829, 2007.

LEE, S. K.; STACK, A.; KATZOWITSCH, E.; AIZAWA, S. I.; SUERBAUM, S.; JOSEPHANS, C. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. **Microbes Infect.** v. 5, p. 1345-1346, 2003.

LEIBOVICI, D.; GROSSMAN, H. B.; DINNEY, C. P.; MILLIKAN, R. E.; LERNER, S.; WANG, Y.; GU, J.; DONG, Q.; WU, X. Polymorphisms in Inflammation Genes and Bladder Cancer: From Initiation to Recurrence, Progression, and Survival. **J Clin Oncol.** v. 23, p. 5746-5756, 2005.

LEUNG, W. K.; CHAN, M. C.; TO, K. F.; MAN, E. P.; NG E. K.; CHU, E. S.; LAU, J. Y.; LIN, S. R.; SUNG, J. J. *H. pylori* genotypes and cytokine gene polymorphisms influence the development of gastric intestinal metaplasia in a Chinese population. **Am J Gastroenterol.** v. 4, n. 101, p. 714-20, 2006.

LIAO, W. C.; LIN, J. T.; WU, C. Y.; HUANG, S. P.; LIN, M. T.; WU, A. S.; HUANG, Y. J.; WU, M. S. Serum interleukin-6 level but not genotype predicts survival after resection in stages II and III gastric carcinoma. **Clin Cancer Res.** v.14, p.428-34, 2008.

LIMA, V. P.; DE LIMA, M. A.; FERREIRA, M. V.; BARROS, M. A.; RABENHORST, S. H. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *Int J Infect Dis.* n. 14, p. 613-617, 2010.

LIMA, V. P.; RABENHORST, S. H. Genes associados a virulência do *Helicobacter pylori*, *Rev. Bras. de Cancerol.* v. 4, n. 55, p. 389-396, 2009.

MAEDA, S.; YOSHIDA, H.; IKENOUE, T.; OGURA, K.; KANAI, F.; KATO, N.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut.* v. 3, n. 44, p. 336-341, 1999.

MAGALHÃES A. F.; CORDEIRO F.T.; QUILICI F. A.; MACHADO G.; AMARANTE H. M. B. S.; PROLLA J. C.; LEITÃO O.R.; ALVES O. R. A.; SAKAI P. Livro da SOBED: Endoscopia digestiva – diagnóstica e terapêutica. p.287 – 288, 2005.

MARSHALL, B. J.; ARMSTRONG, J. A.; McGECHIE, D. B. Attempt to fulfill Koch`s postulate for pyloric Campilobacter. **Med. F. Austr.**, v. 142, p. 436 – 439, 1985.

MEINE, G. C.; ROTA, C.; DIETZ, J.; SEKINE, S.; PROLLA, J. C. Relationship between *cagA*-positive *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer: a case control study in Porto Alegre, RS, Brazil. *Arq Gastroenterol.* v. 48, n.1, p. 41-5, 2011.

MÓDENA, J. L. P.; SALES, A. I. L.; OLSZANSKI, A. G.; RUSSO, R.; VILELA, M. A. R.; FUKUHARA, Y.; SILVEIRA, W. D.; MÓDENA, J. L.; OLIVEIRA, R. B.; BROCCHI, M. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the *cag* pathogenicity island. *Diagn Microbiol Infect Dis.* n. 59, p. 7-16, 2007.

MONTECUCCO, C.; RAPPUOLI, R. Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* Survives in the Human Stomach. *Mol. Cell Biol.* n. 2, p. 457- 466, 2001.

MOTTA, C. R. A.; CUNHA, M. P. S. S.; QUEIROZ, D. M. M.; CRUZ, F. W. S.; GUERRA, E. J. C.; MOTA, R. M. S.; BRAGA, L. L. B. C. Gastric Precancerous Lesions and *Helicobacter pylori* Infection in Relatives of Gastric Cancer Patients from Northeastern Brazil. *Digestion*, n. 78, p. 3–8, 2008.

MULLER, L. B.; FAGUNDES, R. B.; MORAES, C. C.; RAMPAZZO, A. Prevalência da Infecção por *Helicobacter pylori* e das Lesões Precursoras do Câncer Gástrico em Pacientes Dispépticos. *Arq Gastroenterol.* n. 44, p. 93-98, 2007.

NISHINO, Y.; INOUE, M.; TSUJI, I.; WAKAI, K.; NAGATA, C.; MIZOUE, T.; TANAKA, K.; TSUGANE, S. Tobacco Smoking and Gastric Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japanese Population. *Jpn J Clin Oncol.* v. 36, n.12, p. 800–807, 2006.

O'KEEFFE, J.; MORAN, A. P. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* v. 13, p. 1-19, 2008.

OLBERMANN, P.; JOSEPHANS, C.; MOODLEY, Y.; UHR, M.; STAMER, C.; VALTERIN, M.; SUERBAUM, S.; ACHTMAN, M.; LINZ, B. A Global Overview of the Genetic and Functional Diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* Pathogenicity Island. *PLoS Genet.* V.6, e1001069, 2010.

OTTEMANN, K. M.; LOWENTHAL, A. C. *Helicobacter pylori* Uses Motility for Initial Colonization and To Attain Robust Infection. *Inf Immun.* v. 4, n.70 p. 1984–1990, 2002.

PAKSERESHT, M.; FORMAN, D.; MALEKZADEH, R.; YAZDANBOD, A.; WEST, R. M.; GREENWOOD, D. C.; CRABTREE, J. E.; CADE, J. E. Dietary habits and gastric cancer risk in north-west Iran. *Cancer Causes Control.* V. 22, p. 725–736, 2011.

PASSARO, D. J.; CHOSY, E. J.; PARSONNET, J. *Helicobacter pylori*: Consensus and Controversy. *J Clin Inf Dis.* n. 35, p. 298–304, 2002.

PEEK JR, R. M.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature*, v. 2, p. 28-37, 2002.

PEEK JR, R. M.; FISKE, C.; WILSON, K. T. role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. **Physiol. Rev.** v. 90, p. 831-858, 2010.

RAD, R. et al. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. **Journal of Infectious Diseases**, v.188, p. 272–281, 2003.

REYES-LEON, A.; ATHERTON, J. C.; ARGENT, R. H.; PUENTE, J. L. TORRESI, J. Heterogeneity in the Activity of Mexican *Helicobacter pylori* Strains in Gastric Epithelial Cells and Its Association with Diversity in the *cagA* Gene. *Infection and Immunity*. v. 7, n. 75, p. 3445-3454, 2007.

RODRIGUES, L. G. M.; NOGUEIRA, A. M. M. F.; ARAÚJO, L. A.; SALLES, P. G. O.; CARVALHO, S. P.; CABRAL, M. M. D. A. Metaplasia intestinal e carcinoma gástrico: correlação com os subtipos histológicos da neoplasia. **J Bras de Patologia**. n. 37, p. 279 – 286, 2001.

SANTILLA, S.; SAVINAINEN, K.; HURME, M. presence of the *IL-1RA* allele 2 (*IL-1RN\*2*) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro. **Scand. J. Immunol.** v. 47, p. 195-198, 1998.

SHIBATA, A. et al. CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutation in gastric adenocarcinoma. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 3, p. 419 – 424, 2002.

SHIMAZU, T.; TSUJI, I.; INOUE, M.; WAKAI, K.; NAGATA, C.; MIZOUE, T.; TANAKA, K.; TSUGANE, S. Alcohol Drinking and Gastric Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japan Population. **Jpn J Clin Oncol**. v. 38, n. 1, p. 8–25, 2008.

SNOUSSI, K.; MAHFOUDH, W.; BOUAOUINA, N.; FEKIH, M.; KHAIRI, H.; HELAL, A. N.; CHOUCANE, L. Research article Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. **BMC Cancer**. v. 10, p. 1-12, 2010.

SOMMER, F.; FLLER, G.; ROLLINGHOFF, M.; KIRCHNER, T.; MAK, T. W.; LOHOFF, M. Lack of gastritis and of adaptative immune response in interferon

regulatory factor-1-deficient mice infected with *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Immunol.** v. 31, p. 396-402, 2001.

STOICOV, C.; WHARY, M.; ROGERS, A. B.; LEE, F. S.; KLUCEVSEK, K.; LI, H.; CAI, X.; SAFFARI, R.; GE, Z.; KHAN, I. A.; COMBE, C.; LUSTER, A.; FOX, J. G.; HOUGHTON, J. Coinfection modulates inflammatory responses and clinical outcome of *Helicobacter felis* and *Toxoplasma gondii* infections. **J. Immunol.** v. 173, p. 3329-36, 2004.

STOLTE, M.; MEINING, A. The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. *Can J Gastroenterol.* v. 9, n. 15, p. 591-518, 2001.

SOZZI, M.; TOMASINI, M. L.; VINDIGNI, C.; ZANUSSI, E.; TEDESCHI, R.; BASAGLIA, G.; FIGURA, N.; PAOLI, P. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection, *J Lab Clin Med.* n. 146, p. 262–270, 2005.

SUERBAUM, S. The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol.* n. 3, p. 168–170, 1995.

SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature.* v. 6, n.5 , p. 441-452, 2007.

SUERBAUM, S.; MICHETT, P. Medical Progress: *Helicobacter pylori* Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002.

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

TAGUCHI, A.; OHMIYA, N.; SHIRAI, K.; MABUCHI, N.; ITOH, A.; HIROOKA, Y.; NIWA, GOTO, Y. H. Interleukin-8 Promoter Polymorphism Increases the Risk of Atrophic Gastritis and Gastric Cancer in Japan. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 11, p. 2487-2493, 2005.



TOMASINI, M. L.; ZANUSSI, S.; SOZZI, M.; TEDESCHI, R.; BASAGLIA, G.; DE PAOLI, P. Heterogeneity of *cag* genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* v. 3, n. 41, p. 976-80, 2003.

TOMBOLA, F.; MORBIATO, L.; GIUDICE, G. D.; RAPPUOLI, R.; ZORATTI, M.; PAPINI, E. The *Helicobacter pylori vacA* toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J. Clin. Invest.* N. 108, p. 929-937, 2001.

UNDERWOOD, P. C.; CHAMARTHI, B.; WILLIAMS, J. S.; SUN, B.; VAIDYA, A.; RABY, B. A.; LASKY-SU, J.; HOPKINS, P. N.; ADLER, G. K.; WILLIAMS, G. H. Replication and meta-analysis of the gene-environment interaction between body mass index and the interleukin-6 promoter polymorphism with higher insulin resistance. **Met Clin and Experiment.** v. 61, p. 667– 671, 2012.

VIALA, J.; CHAPUT, C.; BONECA, I. G.; CARDONA, A.; GIRARDIN, S. E.; MORAN, A. P.; ATHMAN, R.; MÉMET, S.; HUERRE, M. R.; COYLE, A. J.; DISTEFANO, P. S.; SANSONETTI, P. J.; LABIGNE, A.; BERTIN, J.; PHILPOTT, D. J.; FERRERO, R. L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island. *Nature Immunology.* v. 5, n. 11, p. 1166-1174, 2004.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lacnet**, v. 1, p. 1273 – 1275, 1983.

WEN, S.; MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. **Cancer Lett.** v. 282, p. 1-8, 2009.

WERNER, M.; BECKER, K. F.; KELLER, G.; HOFER, H.; Gastric adenocarcinoma: Pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol.* n. 127, p. 207-216, 2001.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X-F.; ACHONG, M. K. IL-6 Is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses. **J. Clin. Invest.** v. 101, p. 311-320, 1998.

YÁNEZ, M. A.; BARBERÁ, V. M.; SORIA, E.; CATALÁN, V. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*. **J Appl Microbiol.** n. 107, p. 416–424, 2009.

YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA T, SAWAI N, KASHIMA K, IMANISHI J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. **Gut**, 41(4): 442-51, 1997.

YAMAOKA, Y. et al. Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1 $\beta$  and 8 production, and *cagA* status. **Gut**, v. 45, p. 804–811, 1999.

YAMAOKA, Y.; KATO, M.; ASAKA, M. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence Can be Explained by Differences between *Helicobacter pylori* Strains. **Inter Med**, v. 47, p. 1077-1083, 2008.

YAMAZAKI, S.; et. al. Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori*, Associated with Peptic Ulcer in Japan. **J Clin Microbiol.** n. p. 3906–3916, 2005.

YÁNEZ, M. A.; BARBERÁ, V. M.; SORIA, E.; CATALÁN, V. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* in water samples by real-time PCR amplification of the *cag* pathogenicity island gene, *cagE*. **J Appl Microbiol.** n. 107, p. 416–424, 2009.

YUASA Y. Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. **Nature**, v. 3, p. 592-600, 2003.

ZHANG, Q. B. et al. Relationship between mucosal levels of *Helicobacter pylori*-specific IgA, interleukin-8 and gastric inflammation. **Clin Sci**, v. 96, p. 409-414, 1999.

## 6.0 – Resultados e Discussão: Artigo

Os resultados e discussões foram colocados em forma de artigo à ser submetido à Molecular Carcinogenesis, fator de impacto: 3.265 – Qualis A2 (Ciências Biológicas III).

### **How the Interleukins *IL1B* (-511), *IL1RN*, *IL6* (-174), *IL8* (-251) Polymorphisms are Associated for Gastric Lesions development?**

Francivandi Coelho Barbosa<sup>1</sup>, Débora Menezes da Costa<sup>1</sup>, Valeska Portela Lima<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Cardoso<sup>2</sup>, Valdir Queiroz Balbino<sup>2</sup>, Silvia Helena Barem Rabenhorst<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará, Department of Pathology and Forensic Medicine, Cel. Nunes de Melo street, 1315, Porangabussu – CEP 60183-630, Fortaleza - CE, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Department of Genetic, Prof. Nelson Chaves Street, s/n, Cidade Universitária - CEP 50732-970, Recife – PE, Brazil.

\* Silvia Helena Barem Rabenhorst

Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina

Department of Pathology and Forensic Medicine

Cel. Nunes de Melo street, 1315

Porangabussu – CEP 60183-630

Fortaleza - CE, Brazil

Tel.: +55 (85) 3366.8639

Fax.: +55 (85) 3367.3840

e-mail: srabenhorst@hotmail.com

## INTRODUCTION

Since it was discovered, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection has been associated with occurrence of various gastrointestinal diseases as gastritis, intestinal metaplasia and cancer (DUNN et al., 1997). Although most infected persons remain asymptomatic, 5–10% of *H. pylori*-positive individuals will develop the associated diseases (PAKSERESHT et al., 2011). The ability of *H. pylori* to cause gastric mucosal damage is associated with differences in the immune response of the host, the virulence of the infecting organism, and other factors (DABIRI et al., 2009).

*H. pylori* infection causes a strong inflammatory response and is associated with increased gastric mucosal levels of proinflammatory cytokines, especially interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-1RN, IL-6 and IL-8 (EL-OMAR, 2001; SANTILLA et al., 1998; GATTI et al., 2007; SUGIMOTO et al., 2010).

Polymorphisms in these interleukins have been associated with risk of some gastrointestinal diseases (LIAO et al., 2008). Among the polymorphisms described in these cytokines is worth noting *IL1B* -511 C/T (rs16944), which was associated with the development of intestinal metaplasia (IM) and gastric cancer (GC) (YAMAOKA et al., 1999; EL-OMAR et al., 2000; KANG et al., 2012). Beyond this, *IL1RN* gene has a penta allelic variation in the number of repetitions of an 86 bp sequence located on intron 2 of this gene. These repetitions can generate a short allele, with two replicates (*IL1RN* 2\*), or a long allele (*IL1RN* L), containing three to six replicates (SANTILLA et al., 1998). Some studies found an increased risk of carriers of the polymorphic allele (*IL1RN* 2\*) to develop GC, chronic atrophic gastritis and chronic non-atrophic gastritis (EL-OMAR et al., 2001; HE, B-S. et al., 2011). Otherwise *IL1B* and *IL1RN*, the *IL6* gene polymorphism -174 G/C (rs1800795) seems to be the only one that affects transcription of this gene. There are few studies that have studied this polymorphism in gastric disease and their results are conflicting (HWANG et al., 2003; GATTI et al., 2003). Studies in other diseases have shown wild allele (-174G) associated with juvenile chronic arthritis (FISHIMAN et al., 1998), atherosclerosis (BENNERMO et al., 2004), and insulin-resistant diabetes (UNDERWOOD et al., 2012). In *IL8* gene, *IL8* -251 A/T (rs4073)

polymorphism is related to increased risk of developing breast (SNOUSSI et al., 2010), bladder (LEIBOVICI et al., 2005) and stomach (KANG et al. 2009) cancer.

Most of the studies realized with GC and *IL1B* -511, *IL1RN* and *IL8* -251 polymorphisms compare the GC group with normal gastric mucosal groups and a few of them observe more than two gastric diseases. Therefore, the aim of this study is to identify if the presence of the polymorphisms *IL1B* -511 C/T, *IL1RN*, *IL6* -174 G/C and *IL8* -251 A/T are associated with more severe gastric lesions, like IM and GC.

## MATERIAL AND METHODS

### *Subjects*

The present study was approved by the Hospital Ethic Committee of the Federal University of Ceará, Brazil, (047.06.09) and General Hospital of Fortaleza (HGF) (070714/10). All subjects signed an informed consent form before included. A total of 324 samples were collected. Samples from 206 patients with dyspeptic symptoms, who underwent endoscopy at three hospitals, Hospital Universitário Walter Cantídeo, Fortaleza (HUWC), Hospital São José and HGF, and had GL confirmed after histopathology. For GL cases were excluded if previous gastric or duodenal surgery had been performed or if there had been recent use of nonsteroidal anti-inflammatory and/or antibiotic drugs. The other 118 samples were from patients that had GC diagnostic and were undergone to gastrectomy at HUWC, HGF and Santa Casa de Misericórdia Hospital, samples were excluded if the histological exam showed less than 80% of tumor cells or if the sample was not cancer. The histological classification was done according Sydney System for GL and Lauren's classification for GC.

### *DNA extraction*

Genomic DNA was extracted from frozen fragments, for GL it was obtained from two fragments of the antrum and body according to the gastric lesion location and for GC it was obtained from tumor tissue, both using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) technique, adapted from the method of Foster and Twell (1996). Tumor extraction was done only in fragments that showed more than 80% of tumor cells. The quality of DNA extraction was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis the DNA amount was determined using the NanoDrop™<sup>®</sup> 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

### *Detection of *H. pylori* infection and recognition of interleukins polymorphisms*

The *H. pylori* infection was detected by PCR amplification of the *urease C* gene, using primers describe by Lage et al. (1995), F 5-

AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT and R 5-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC. Positivity for *H. pylori* was confirmed by the presence of the fragment of 294 bp.

The genetic polymorphisms of *IL1B* -511C/T (rs16944), *IL6* -174G/C (rs1800795) and *IL8* -251A/T (rs4073) were detected by PCR-RFLP, and the *IL1RN* (VNTR) polymorphism was detected by PCR (Table 1).

**Table1- PCR primers used for genotyping interleukins polymorphisms.**

<i>SNP</i>	Primer sequence	Annealing (°C)	Size (bp) of PCR product	Restriction enzyme	Reference
<b><i>IL1B</i> (-511)</b>	F 5' TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC 3' R 5' GTT TAG GAA TCT TCC CACTT 3'	55	304	<i>Ava</i> I	Upadhyay et al., 2008.
<b><i>IL1RN</i></b>	F 5' CTCAGCAACACTCCTAT 3' R 5' TCCTGGTCTGCAGGTAA 3'	58	240, 326, 412, 484, 498	–	Upadhyay et al., 2008.
<b><i>IL6</i> (-174)</b>	F 5' TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT 3' R 5' CTGATTGGAAACCTTATTAAG 3'	55	198	<i>Sfa</i> NI	Fernandez-Real et al., 2000.
<b><i>IL8</i> (-251)</b>	F 5' CCATCATGATAGCATCTGTA 3' R 5' CCACAATTTGGTGAATTATTA 3'	57	173	<i>Ase</i> I	Wei et al., 2007.

F- Forward; R- Reverse.

### *Statistical analysis*

The statistical analyses were conducted using the program UNPHASED - 3.1.3 version (Dudbridge, 2008). A p-value less than 0.05 were regarded as statistically significant.

## RESULTS

### *Studied population*

Among of the 118 GC cases 67.8% (80/118) were male and 32.2% (38/118) female. The median of age was 65 years old, ranging from 23 to 92 years old. The most frequent tumor site was the gastric non-cardia [77,1% (91/118)]. Intestinal and diffuse types presented similar frequencies: 52.5% and 47.5%, respectively. Gastric lesions (GL) group accounted with 206 patients, among these, 41.7% (85/206) were male and 58.7% (121/206) female. The median of age from the GL group was 52 years old, ranging from 8 to 88 years old. The most frequent lesion was active chronic gastritis (ACG) 53.9% (111/206), while inactive chronic gastritis (ICG) and IM accounted with only 19.42% and 18.93%, respectively. *H. pylori* was positive in 94.1% (111/118) of the GC cases and in 96.1% (198/206) of the GL cases.

### *Polymorphisms frequency in GL and GC*

The heterozygote genotype of all cytokines studied were the most frequent in patients with GC (*IL1B* CT 52,5%; *IL1RN* L\*2 56,8%; *IL8* AT 61,9%; *IL6* GC 41,5%). Patients with GL showed a higher frequency of homozygous wild genotype of *IL-1RN* gene (*IL1RN* LL 48,1% vs. L\*2 38,8% and \*2\*2 13,1%) and of homozygous polymorphic genotype of *IL6* gene (*IL6* CC 56,3% vs. GG 8,7% and GC 35,0%). The other cytokine genes demonstrated similar frequency in both groups (*IL1B* CT 55,8%; *IL8* AT 51,5%).

### *Comparison between GC and GL on the distribution of cytokines IL1B, IL1RN, IL6 and IL8 SNPs*

When the genotypic frequency of the studied polymorphisms were compared among all lesions (GC vs. GL), a significant association with *IL8* homozygous polymorphic genotype (TT) and homozygous wild genotype of *IL-6* (GG) and *IL1RN* (LL) with GC (p= 0,0065, p= 0,0012 e p=0,0052, respectively) were found. This results



were confirmed by allelic frequencies analyze for *IL8*T and *IL6*G alleles ( $p = 0.0142$  and  $p = 9.96 \times 10^5$ , respectively).

Comparisons were also done considering the presence of each allele of studied interleukins, combined into pairs (2x2), triples (3x3) and blocks (4x4). The haplotype analyses of 2x2 association showed that all pairs that had the more inflammatory alleles were significant associated with GC, except *IL1B*x*IL1RN* and *IL8*x*IL1RN* pairs (Table 2). In 3x3 analyses, all triple sets had their more inflammatory haplotypes associated with GC (Table 3). The haplotype T-T-G-\*2 (*IL1B*x*IL8*x*IL6*x*IL1RN*, respectively) was the most associated with GC (table 4).

**Table 2:** Evaluation of haplotype frequencies of interleukin SNPs, 2x2, of four genes and their association with GC.

SNPs	Haplotypes	GC-Freq	GL-Freq	Association
<i>IL1B</i>	C-A	0,319	0,267	$\chi^2 = 14,189$
	C-T	0,232	0,245	
<i>x</i>	T-A	0,134	0,286	gl = 3
	<b>T-T</b>	0,315	0,202	
<i>IL8</i>	C-C	0,348	0,356	$\chi^2 = 18,864$
	C-G	0,203	0,156	
<i>x</i>	T-C	0,241	0,382	gl = 3
	<b>T-G</b>	0,208	0,106	
<i>IL6</i>	C-L	0,436	0,381	$\chi^2 = 4,224$
	C-*2	0,115	0,131	
<i>x</i>	T-L	0,212	0,294	gl = 3
	T-*2	0,237	0,194	
<i>IL1RN</i>	A-C	0,278	0,422	$\chi^2 = 19,991$
	A-G	0,175	0,131	
<i>x</i>	T-C	0,311	0,316	gl = 3
	<b>T-G</b>	0,236	0,131	
<i>IL8</i>	A-L	0,326	0,372	$\chi^2 = 7,479$
	A-*2	0,127	0,181	
<i>x</i>	T-L	0,322	0,303	gl = 3
	T-*2	0,225	0,144	
<i>IL1RN</i>	C-L	0,362	0,501	$\chi^2 = 16,409$
	C-*2	0,227	0,237	
<i>x</i>	G-L	0,286	0,173	gl = 3
	<b>G-*2</b>	0,125	0,089	
<i>IL6</i>				$p = 0,0003$
<i>x</i>				$p = 0,0002$
<i>IL1RN</i>				$p = 0,0581$
<i>x</i>				$p = 0,0009$

GC-Freq = Frequency of the patients with GC; GL-Freq = Frequency of the patients with GL.  
Statistically significant value is shown in bold

**Table 3:** Evaluation of haplotype frequencies of interleukins SNPs, 3x3, of four genes and their association with GC.

Order	SNPs	Haplotypes	GC	GL	GC-Freq	GL-Freq
1-2-3	<i>IL1B</i> x <i>IL8</i> x <i>IL6</i>	C-A-C	42,3	86,6	0,179	0,210
		C-A-G	31,5	23,8	0,133	0,058
		C-T-C	42,1	60,3	0,178	0,146
		C-T-G	14,1	40,4	0,060	0,098
		T-A-C	22,3	87,9	0,095	0,214
		T-A-G	10,9	29,7	0,046	0,072
		T-T-C	32,3	69,2	0,137	0,168
		<b>T-T-G</b>	40,5	14,1	0,172	0,034
<b>Association</b>			$\chi^2 = 35,309$		gl = 7, <b><math>p = 9,78 \times 10^{-6}</math></b>	
1-2-4	<i>IL1B</i> x <i>IL8</i> x <i>IL1RN</i>	C-A-L	61,9	93,2	0,263	0,226
		C-A-*2	13,6	14,7	0,057	0,036
		C-T-L	41,3	64,2	0,175	0,156
		C-T-*2	13,2	38,9	0,056	0,094
		T-A-L	16,0	60,9	0,068	0,148
		T-A-*2	15,4	59,1	0,065	0,143
		T-T-L	33,8	59,7	0,143	0,145
		<b>T-T-*2</b>	40,8	21,3	0,173	0,052
<b>Association</b>			$\chi^2 = 21,559$		gl = 7, <b><math>p = 0,003</math></b>	
1-3-4	<i>IL1B</i> x <i>IL6</i> x <i>IL1RN</i>	C-C-L	58,1	106,8	0,246	0,259
		C-C-*2	23,8	39,5	0,101	0,096
		C-G-L	43,9	49,9	0,186	0,121
		C-G-*2	4,2	14,7	0,018	0,035
		T-C-L	28,0	99,6	0,119	0,242
		T-C-*2	29,1	58,1	0,123	0,141
		T-G-L	23,0	21,7	0,097	0,053
		<b>T-G-*2</b>	25,9	21,7	0,110	0,053
<b>Association</b>			$\chi^2 = 23,122$		gl = 7, <b><math>p = 0,0016</math></b>	
2-3-4	<i>IL8</i> x <i>IL6</i> x <i>IL1RN</i>	A-C-L	45,8	126,2	0,194	0,306
		A-C-*2	19,7	49,2	0,083	0,119
		A-G-L	31,6	27,7	0,134	0,067
		A-G-*2	9,9	24,9	0,042	0,060
		T-C-L	39,7	80,1	0,169	0,195
		T-C-*2	33,8	48,5	0,143	0,118
		T-G-L	35,8	43,9	0,152	0,107
		<b>T-G-*2</b>	19,7	11,5	0,083	0,028
<b>Association</b>			$\chi^2 = 24,313$		gl = 7, <b><math>p = 0,001</math></b>	

GC-Freq = Frequency of the patients with GC; GL-Freq = Frequency of the patients with GL.

Statistically significant value is shown in bold.

**Table 4:** Evaluation of haplotype frequencies of SNPs, 4 x 4, of four genes and their association with GC.

Order	SNPs	Haplotypes	GC	GL	GC-Freq	GL-Freq
1-2-3-4	<i>IL1B</i> x <i>IL8</i> x <i>IL6</i> x <i>IL1RN</i>	C-A-C-L	34,0	75,6	0,144	0,183
		C-A-C-B	9,3	11,8	0,039	0,028
		C-A-G-L	28,1	18,5	0,119	0,045
		C-A-G-B	3,7	2,9	0,016	0,007
		C-T-C-L	25,9	33,1	0,110	0,080
		C-T-C-B	14,8	27,5	0,063	0,067
		C-T-G-L	14,2	29,7	0,060	0,072
		C-T-G-B	0,0	11,9	0,000	0,029
		T-A-C-L	12,9	51,3	0,055	0,125
		T-A-C-B	8,2	36,9	0,035	0,089
		T-A-G-L	3,1	9,7	0,013	0,024
		T-A-G-B	7,7	21,3	0,033	0,052
		T-T-C-L	13,6	46,0	0,057	0,112
		T-T-C-B	20,3	21,8	0,086	0,053
		T-T-G-L	21,3	14,0	0,090	0,034
		<b>T-T-G-B</b>	18,9	0,0	0,080	0,000
<b>Association</b>			$\chi^2 = 47,647$		gl = 15, <b><math>p = 2,89 \times 10^{-5}</math></b>	

GC-Freq = Frequency of the patients with GC; GL-Freq = Frequency of the patients with GL.

Statistically significant value is shown in bold.

*Comparison between the different GL considering the genotype, allele and haplotype combinations and the SNPs of IL1B, IL1RN, IL6 and IL8*

When IM was compared with ICG and ACG, no significant result was found in any analyze aforementioned. Also, ACG was compared with ICG and no significant association was observed.

*Comparison between GC and the GL considering SNPs of IL1B, IL1RN, IL6 and IL8*

The genotype analyses of ICG and GC showed significant association of carriers of *IL6* homozygous wild type genotypes (GG) ( $p=0,0344$ ) with GC. This result was confirmed by allelic frequencies analyze ( $p=0,01233$ ), which showed that *IL6G* allele was the most associated with GC. No significant association was found in these analysis considering the haplotypes formed by the association of the four ILs and inactive chronic gastritis and gastric cancer ( $p=0,1045$ ).

When IM and GC was compared, the genotype analyses showed that carriers of *IL8* heterozygote (AT) and *IL6* homozygous wild (GG) genotypes were significant associated with GC ( $p=0,0426$ ;  $p=0,0475$ , respectively). However, allelic frequencies indicate significant association only with wild allele of *IL6* gene ( $p=0,0389$ ). The analyses of haplotype blocks showed no significant association.

The genotype analyses between ACG and GC demonstrate a significant association of *IL1RN* and *IL8* heterozygote genotypes and *IL-6* wild genotype with GC (Table 5). The allelic frequencies, table 6, corroborate the genotype analyses for *IL6* and *IL8* genes. The haplotype analyses, considering the genetic polymorphism of all ILs studied, showed that the T-T-G-\*2 haplotype (IL-1B, IL-8, IL-6, IL-1RN, respectively) was statically the most associated with GC ( $p=5,72 \times 10^{-5}$ ).

**Table 5:** Evaluation of genotype frequencies of SNPs of four genes and their association with chronic active gastritis and GC.

SNPs	Genotypes	GC-Freq	CActiveG-Freq	Association
<i>IL1B</i>	C/C	0,288	0,254	$\chi^2 = 0,410$
	C/T	0,526	0,560	gl = 2
	T/T	0,186	0,186	$p = 0,8144$
<i>IL8</i>	A/A	0,144	0,336	$\chi^2 = 12,870$
	A/T	0,619	0,485	gl = 2
	<b>T/T</b>	0,237	0,179	$p = \mathbf{0,0016}$
<i>IL6</i>	C/C	0,382	0,619	$\chi^2 = 15,653$
	C/G	0,415	0,291	gl = 2
	<b>G/G</b>	0,203	0,090	$p = \mathbf{0,0004}$
<i>IL1RN</i>	L/L	0,364	0,487	$\chi^2 = 10,654$
	L/*2	0,568	0,371	gl = 2
	<b>*2/*2</b>	0,068	0,142	$p = \mathbf{0,0049}$

GC-Freq = frequencies of patients with GC; CActiveG-Freq = frequencies of patients with chronic active gastritis. Statistically significant value is shown in bold.

**Tabela 6:** Evaluation of allelic frequencies of SNPs of four genes and their association with chronic active gastritis and GC.

SNPs	Alleles	GC-Freq	CActiveG-Freq	Association
<i>IL1B</i>	C	0,551	0,534	$\chi^2 = 0,151$
	T	0,449	0,466	gl = 1 $p = 0,6979$
<i>IL8</i>	A	0,453	0,578	$\chi^2 = 7,869$
	<b>T</b>	0,547	0,422	gl = 1 $p = \mathbf{0,005}$
<i>IL6</i>	C	0,589	0,765	$\chi^2 = 17,989$
	<b>G</b>	0,411	0,235	gl = 1, $p = \mathbf{2,22 \times 10^{-5}}$
<i>IL1RN</i>	L	0,648	0,672	$\chi^2 = 0,304$
	*2	0,352	0,328	gl = 1 $p = 0,5811$

GC-Freq = frequencies of patients with GC; CActiveG-Freq = frequencies of patients with chronic active gastritis. Statistically significant value is shown in bold.

## DISCUSSION

In the current study, it is investigated the relationship between the *IL1B* -511 C/T, *IL1RN* (VNTR), *IL6* -174 G/C and *IL8* -251 A/T polymorphisms and the different gastric lesions in a populations from northeast of Brazil. The frequency of *IL1B* and *IL1RN* found in this study for gastric cancer (GC) and the other gastric lesions (GL) were similar to that found in studies from Asia (HE et al., 2011; WANG et al., 2011; KANG et al., 2012), Portuguese (MACHADO et al., 2003) and north brazilian populations (BARBOSA et al., 2009). Also, the *IL8* frequencies were in agreement to those found in Asian (LEE et al., 2005; TAGUCHI et al., 2005; LI et al., 2010), Spanish (GARZA-GONZALES, 2007) and Portuguese (CRUSIUS et al., 2008) population. Conversely, a higher frequency of the *IL6* polymorphic genotype (CC *IL6* polymorphism, this study find) found in this study (56%), comparing to El-Omar et al. (2003) and Hwang et al. (2003) studies in (11% and 3%, respectively), and till when was considering a Brazilian study with patients from Pará (25% for GC and 13% for chronic gastritis) (GATTI et al., 2007) the frequency found in this study was higher. However, the frequency found in this study was much lower than that found by Kang et al. (2009) in Seoul patients (99.2%). *H. pylori* infection was present in most of the CG and GL patients included in this study (94,1% for GC and 96,1% for GL). This data is in agreement to the literature (GATTI et al., 2005; LEE et al., 2005; PELETEIRO et al., 2010; LI et al., 2010).

When the frequencies of the IL polymorphisms studied was compared between the GC and the GL, a significant association between the presence of the polymorphic allele of interleukins *IL8* -251T and *IL6* -174G and the gastric cancer cases was found. These data were in agreement with Lee et al. (2005) study, which showed an increased risk for diffuse-type and mixed-type gastric carcinomas with the presence of *IL8* -251T allele. The association of *IL6* -174 C>G polymorphism with GC risk is contradictory (YIN et al., 2012), however Gatti et al. (2007) found in a north Brazilian population that *IL6* -174GG was an important factor that is associated with poor prognosis of the clinical outcome in adenocarcinoma genesis. No association was found between *IL1B* and *IL1RN* polymorphism and any gastric disease included in this study. This last data

was not expected seeing that several authors found that *IL1B* -511TT, *IL1RN*\*2 (HE et al., 2011; MACHADO et al., 2001; XUE et al., 2010) and -251T (LEE et al., 2005) associated with the increased risk of GC. However, it must be taken in account the fact that in this study the control group was formed by patients with gastric lesions and the authors in the aforementioned had performed the analysis using as control patients with normal gastric mucosal.

It is known that an allelic variation at a complex disease, like GC, the locus may be extensive, with multiple susceptibility alleles of independent origin, wherefore the hypothesis of a single susceptibility allele may be inappropriate to study prospects for associations to identify complex disease genes. Therefore, the analyses based on haplotypes are advantageous over an analysis based on individual SNPs (MORRIS; KAPLAN, 2002).

The haplotype analysis taking in account ILs associated 2x2 (Table 2), showed significant association with the most inflammatory haplotypes and GC, except for *IL1B*x*ILRN* and *IL8*x*IL1RN* haplotypes. However, the combination of 3 ILs alleles was considered (3x3 haplotypes, Table 3), all the inflammatory haplotypes were significant associated with CG. Considering the association of the four studied ILs, the T-T-G-\*2 (*IL1B*x*IL8*x*IL6*x*IL1RN*) haplotype was significant associated with GC (Table 4). In fact, this haplotype was present only in GC cases, suggesting that haplotype combination is a good marker to GC risk.

In the analyses considering each precancerous lesion, no significant association was found for all ILs polymorphisms studied, when IM was compared with ICG and ACG and when ACG was compared to ICG no significant statically association were found. This result is in agreement form Kato et al (2006) findings, which showed no association of *IL1B* and *IL6* polymorphisms and precancerous gastric lesion. Conversely, *IL8* -251A/T and *IL1B* -511 C/T polymorphisms were associated with increasing risk to develop IM by Kang et al., 2012 and Li et al., 2010, respectively, and *IL1RN* \*2\*2 genotype was observed to increased risk of gastric precancerous lesions by Peleteiro et al., 2010.

When each precancerous lesion (ICG, ACG and IM) was compared with GC, it was observed in this study that the wild allele of *IL6* gene (*G*) was associated with GC.

This result was similar to findings realized in a north Brazilian population by Gatti et al. (2007), which observed an association between *GG* genotype of -174 polymorphism and GC, independent of the specific histological type. It is known that *H. pylori* infection is an important factor to the development of gastric lesions (GIUDICEG et al., 2006; SUERBAUM; MICHETTI, 2002; KHALIFA, 2010) and it is known that, IL-6 level is important in the chronic phase of *H. pylori*-related gastric inflammation and for gastric carcinogenesis (FISHIMA et al,1998; WONG et al., 2011; SUGIMOTO et al, 2011). Since almost of all cases included in this study were infected by *H. pylori*, the presence of *IL6*-174G polymorphism, which increase IL-6 level, justify the associated finding in this study.

Comparing GC with ACG it was also observed that GC was associated with *IL1RN* L\*2 genotype (Table 5), *IL8* -251T allele (Table 6) and T-T-G\*2 haplotype. Confirming the find that T-T-G\*2 haplotype is a good marker to GC. In the haplotype analyses made with GC vs. ICG and GC vs. IM it was not finding association with T-T-G-\*2 haplotype with GC, probably because of the lower number of samples, 40 ICG and 39 IM. Additionally, when CG was compared with IM, *IL8* -251AT genotype was associated with GC and this result was not confirmed by allelic frequencies analyze, however *IL8* -251T allele drove IL-8 expression 2 - to 5-fold strongly than the *IL8* -251A allele (LEE et al., 2005).

## CONCLUSION

In conclusion, this study showed the importance of *IL6* -174G allele *IL1RN* \*2 and *IL8* -251T in GC and suggest the T-T-G-\*2 haplotype as a good marker for GC. This study also demonstrated the importance of the haplotype analysis, which can justify the controversies on the individual analyses. This study it was not taking account *H. pylori* genotypes and furthers studies have to be performed to investigate the role played by the interaction of host genotypic constitution with different *H. pylori* strains in gastric carcinogenesis.

## REFERENCES

BENNEMOR, M.; HELD, C.; STEMME, S.; ERICSSON, C. G.; SILVEIRA, A.; GREEN, F.; TORNVALL, P. Genetic predisposition of the interleuin-6 respose to inflammation: implication for a varienty of major disease? **Clin Chem.** v. 50, p. 2136-2140, 2004.

CRUSIUS, J. B. A. F.; CAPELLÁ, C.; PENÁ, G. A. S.; PERA, G.; SALA, N.; AGUDO, A.; RICO, F.; GIUDICE, G. D., PALLI, D.; PLEBANI, M.; BOEING, H.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; F. PALA, C. V.; SAVE, V. E.; VINEIS, P.; TUMINO, R.; PANICO, S.; BERGLUND, G.; MANJER, J.; STENLING, R.; HALLMANS, G.; MARTÍNEZ, C.; DORRONSORO, M.; BARRICARTE, A.; NAVARRO, C.; QUIRÓS, J. R.; ALLEN, N.; KEY, T. J.; BINGHAN, S.; CALDAS, C.; LINSEISEN, J.; KAAKS, R.; OVERVAD, K.; TJØNNELAN, A.; BÜCHNER, F.C.; PEETERS, P. H. M.; NUMANS, M. E.; CLAVEL-CHAPELON, F.; TRICHOPOULOU, A.; LUND, E.; JENAB, M.; RINALDI, S.; FERRARI, P.; RIBOLI, E.; GONZÁLEZ, C. A. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric câncer. **Annals of Oncology.** v. 19, p. 1894–1902, 2008.

DABIRI H, et al. Distribution of *Helicobacter pylori* *cagA*, *cagE*, *oipA* and *vacA* in different major ethnic groups in Tehran, Iran. **J Gastroenterol and Hepatol.** v. 24, p. 1380–1386, 2009.

DUNN B. E.; COHEN H.; BLASER M.J. *Helicobacter pylori*. **Clin. Microbiol. Rev.** v.10, n.4, p. 720-741, 1997.

EL-OMAR, E.M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v. 404, p. 398–402, 2000.

EL-OMAR E M. The importance of interleukin 1 $\beta$  in *Helicobacter pylori* associated disease. **Gut.** v. 48, p. 743–747, 2001.

EL-OMAR, E. M.; RABKIN, C. S.; GAMMON, M. D.; VAUGHAN, T. L.; RISCH, H. A., SCHOENBERG, J. B.; STANFORD, J. L.; MAYNE, S. T.; GOEDERT, J.; BLOT, W. J.; FRAUMENI JR, J. F.; CHOW, W- H. Cytokine gene polymorphisms and the



risk of adenocarcinoma of the stomach in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST). **GASTROENTEROLOGY**. v. 124, p. 1193–1201, 2003.

FISHIMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene of IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**. v. 102, p. 1369-1372, 1998.

FOX, J. G.; WANG, T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. **J. of Clinical Investigation**. v. 117, n. 1, p. 60-69, 2007.

GARZA-GONZALEZ, E.; BOSQUES-PADILLA, F. J.; MENDOZA-IBARRA, S. I.; FLORES-GUTIERREZ, J. P.; MALDONADO-GARZA, H. J.; PEREZ-PEREZ, G. I. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. **BMC Cancer**. v. 7, n. 70, p. 1-5, 2007.

GATTI, L. L.; BURBANO, R. R.; ZAMBALDI-TUNES, M.; DE-LÁBIO, R. W.; ASSUMPÇÃO, P. P.; CARDOSO-SMITH, M. A.; MARQUES-PAYÃO, S. L. Interleukin-6 Polymorphisms, *Helicobacter pylori* Infection in Adult Brazilian Patients with Chronic Gastritis and Gastric Adenocarcinoma. **Archives of Medical Research**. v. 38, p. 551e555, 2007.

GIUDICEG, D.; MICHETTI, P. Inflammation, immunity and vaccine for *Helicobacter pylori*. *Helicob.* n. 1, p. 21-26, 2006.

HE, B. S.; PAN, Y. Q.; XU, Y. F.; ZHU, C.; QU, L. L.; WANG, S. K. polymorphisms in interleukin-1B (IL-1B) and interleukin receptor antagonist (IL-1RN) genes associated with gastric cancer risk in Chinese population. **Dig. Dis. Sci**. v. 56, p. 2017-2023, 2011.

HWANG, I-R.; HSU, P-I.; PETERSON, L. E.; GUTIERREZ, O.; KIM, J. G.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. Interleukin-6 Genetic Polymorphisms are not Related to *Helicobacter pylori*-Associated Gastroduodenal Diseases. **Helicobacter**, v 8, n 2, p. 142–148.

KANDULSKI, A.; KUESTER, D.; MÖNKEMÜLLER, K.; FRY, L.; MALFERTHEINER, P.; WEX, T. Protease-Activated Receptor-2 (PAR2) in Human

Gastric Mucosa as Mediator of Proinflammatory Effects in *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**. v. 16, p. 452–458.

KANG, J. M.; KIM, N.; LEE, D. H.; PARK, J. H.; LEE, M. K.; KIM, J. S.; JUNG, H. C.; SONG, S. The Effects of Genetic Polymorphisms of IL-6, IL-8, and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced Gastroduodenal Diseases in Korea. **J Clin Gastroenterol**. v. 43, p. 420–428, 2009.

KHALIFA, M. M.; SHARAF, R. R.; AZIZ R. K. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen?. **Gut Pathogens**, v. 2, p. 2-38, 2010.

KATO, I.; DOORN, L-J V.; CANZIAN, F.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S.; VIVAS, J.; LOPEZ, G.; LU, Y.; GIOIA-PATRICOLA, L.; SEVERSON, R. K.; SCHWARTZ, A. G.; MUÑOZ, N. Host–bacterial interaction in the development of gastric precancerous lesions in a high risk population for gastric cancer in Venezuela. **Int. J. Cancer**. v. 119, p. 1666–1671, 2006.

LEE. W-P.; TAI, D-I.; LAN, K-H.; LI, A. F-Y.; HSU, H-C.; LIN, E-J.; LIN, Y-P.; SHEU, M-L.; LI, C-P.; CHANG, F-Y.; CHAO, Y.; YEN, S-H.; LEE, S-D. Interleukin 1B and Interleukin 1RN Polymorphisms Are Associated With Increased Risk of Gastric Carcinoma. **Clin. Cancer Res**. n. 11, v. 18 p. 6431-6441, 2005.

LEIBOVICI,D.; GROSSMAN, H. B.; DINNEY, C. P.; MILLIKAN, R. E.; LERNER, S.; WANG, Y.; GU, J.; DONG, Q.; WU, X. Polymorphisms in Inflammation Genes and Bladder Cancer: From Initiation to Recurrence, Progression, and Survival. **J Clin Oncol**. v. 23, p. 5746-5756, 2005.

LI, Z-W.; WU, Y.; SUN, Y.; LIU, L-Y.; TIAN, M-M.; FENG, G-S.; YOU, W-C.; LI, J-Y. Inflammatory cytokine gene polymorphisms increase the risk of atrophic gastritis and intestinal metaplasia. **World J Gastroenterol**. v. 16, n. 14, p.1788-1794, 2010.

LIAO, W. C.; LIN, J. T.; WU, C. Y.; HUANG, S. P.; LIN, M. T.; WU, A. S.; HUANG, Y. J.; WU, M. S. Serum interleukin-6 level but not genotype predicts survival after resection in stages II and III gastric carcinoma. **Clin Cancer Res**. v.14, p.428-34, 2008.

MACHADO, J. C.; PHAROAH, P.; SOUSA, S.; CARVALHO, R.; OLIVEIRA, C.; FIGUEIREDO, C.; AMORIM, A.; SERUCA, R.; CALDAS, C.; CARNEIRO, F.; SOBRINHO–SIMÕES, M. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: A meta-analysis. **GASTROENTEROLOGY**. v. 121, p.823–829, 2001.

MORRIS, R. W.; KAPLAN, N. L. On the Advantage of Haplotype Analysis in the Presence of Multiple Disease Susceptibility Alleles. **Genetic Epidemiology**. v. 23, p. 221–233, 2002.

PAKSERESHT, M.; FORMAN, D.; MALEKZADEH, R.; YAZDANBOD, A.; WEST, R. M.; GREENWOOD, D. C.; CRABTREE, J. E.; CADE, J. E. Dietary habits and gastric cancer risk in north-west Iran. **Cancer Causes Control**. V. 22, p. 725–736, 2011.

PELETEIRO, B.; LUNET, N.; CARRILHO, C.; DURÃES, C.; MACHADO, J. C.; LA VECCHIA, C.; BARROS, H. Association Between Cytokine Gene Polymorphisms and Gastric Precancerous Lesions: Systematic Review and meta-analysis **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 19, p. 762-776, 2010.

SANTILLA, S.; SAVINAINEN, K.; HURME, M. presence of the *IL-1RA* allele 2 (*IL-1RN\*2*) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro. **Scand. J. Immunol**. v. 47, p. 195-198, 1998.

SHIN, C. M.; KIM, N.; LEE, H. S.; LEE, D. H.; K, J. S.; JUNG, H. C.; SONG, I. S. Helicobacter pylori outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 23 n. 5 p. 411–417, 2011.

SNOUSSI, K.; MAHFOUDH, W.; BOUAOUINA, N.; FEKIH, M.; KHAIRI, H.; HELAL, A. N.; CHOUCANE, L. Research article Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. **BMC Cancer**. v. 10, p. 1-12, 2010.

SUERBAUM, S.; MICHETT, P. Medical Progress: Helicobacter pylori Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002.

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

SUGIMOTO, M.; OHNO, T.; GRAHAM, D. Y.; YAMAOKA, Y. Association Between Cytokine Gene Polymorphisms and Gastric Precancerous Lesions: Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 26, p. 1677–1684, 2011.

TAGUCHI, A.; OHMIYA, N.; SHIRAI, K.; MABUCHI, N.; ITOH, A.; HIROOKA, Y.; NIWA, GOTO, Y. H. Interleukin-8 Promoter Polymorphism Increases the Risk of Atrophic Gastritis and Gastric Cancer in Japan. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 11, p. 2487-2493, 2005.

UNDERWOOD, P. C.; CHAMARTHI, B.; WILLIAMS, J. S.; SUN, B.; VAIDYA, A.; RABY, B. A.; LASKY-SU, J.; HOPKINS, P. N.; ADLER, G. K.; WILLIAMS, G. H. Replication and meta-analysis of the gene-environment interaction between body mass index and the interleukin-6 promoter polymorphism with higher insulin resistance. **Met Clin and Experiment**. v. 61, p. 667– 671, 2012.

WONG, H-L.; RABKIN, C. S.; SHU, X-O; PFEIFFER, R. M.; CAI, Q.; JI, B-T.; YANG, G.; LI, H-L.; ROTHMAN, N.; GAO, Y-T.; ZHENG, W.; CHOW, W-H.

Systemic cytokine levels and subsequent risk of gastric cancer in Chinese Women. **Cancer Sci.** v. 102, n. 10, p. 1911–1915, 2011.

XUE, H.; LIN, B.; NI, P.; XU, H.; HUANG, G. Intrafamilial aggregation of gastric cancer: a comprehensive approach including environmental factors, *Helicobacter pylori* virulence, and genetic susceptibility. **Journal of Gastroenterology and Hepatology.** v. 25, p. 1604–1617, 2010.

YAMAOKA, Y. et al. Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1 $\beta$  and 8 production, and *cagA* status. **Gut.** v. 45, p. 804–811, 1999.

YIN, Y-W.; SUN, Q-Q.; HU, A-M.; WANG, Q.; LIU, H-L.; HOU, Z-Z.; ZENG, Y-H.; XU, R-J.; SHI, L-B.; MA, A-B. Associations Between Interleukin-6 Gene -174 C/G and -572 C/G Polymorphisms and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. **J. Surg. Oncol.** p. 1-7, 2012.



Anexo – I

## Parecer do Comitê de ética



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF

Fortaleza, 12 de julho 2010.

Ilma.sra. comunicamos-lhe o parecer do CEP

Pesquisadora: **Ana Paula Santos do Carmo**Projeto Intitulado: **Identificação genotípica e prevalência de cepas da helicobacter pylori responsáveis pelo desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos: estudos em lesões precursoras.**Área de conhecimento: **Ciências da Saúde / Medicina**Data da entrada no CEP: **26/06/10**Protocolo do CEP: **070714/10**

**Sumário: Objetivo principal da pesquisa** - Determinar os subtipos genéticos das cepas de helicobacter pylori, quanto à presença de genes de virulência circulantes na região estudada, em lesões gástricas de diferentes gravidades. Um número de 200 amostras de pacientes com suspeita de lesões gástricas estudadas (gastrites, úlceras e metaplasia intestinal) será coletado nos ambulatórios dos hospitais. Os locais da pesquisa serão: Hospital Universitário Walter Cantideo (HUWC), Hospital São José (HSJ) e Hospital Geral de Fortaleza (HGF), ambos em Fortaleza. A coleta será feita em condições ideais de assepsia, no momento da endoscopia. A confirmação diagnóstica será dada pelo laudo endoscópico bem como pelo exame histopatológico. Os sujeitos da pesquisa serão pessoas que se dirigem a um destes hospitais com queixa, ou suspeita de doença gástrica e que foi encaminhado ao serviço de endoscopia, o mesmo será abordado momentos antes da realização do exame pelo pesquisador cadastrado junto ao comitê de ética e ao mesmo será explicado do que se trata a pesquisa e quais os possíveis riscos inerentes de sua participação.

**Parecer:**

Informamos a V.Sa., que o Comitê de Ética em pesquisa apreciou o projeto, considerando que o mesmo atende as recomendações da Resolução 196/96 sobre pesquisa com seres humanos e considerando que o mesmo já tem aprovação de outro Comitê, observou-se os aspectos técnicos de viabilização da pesquisa e o CEP/HGF considerou o projeto aprovado.

Lembramos ao pesquisador a entrega do relatório final da pesquisa no CEP e cumprimento dos aspectos ético-legais da pesquisa.

Atenciosamente,

  
 Dr.ª Maria Veraci Oliveira Queiroz  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HGF

## Anexo – II

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Instituição:** DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC

LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM

**Endereço:** R. Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu

**Investigadora Responsável:** Silvia Helena Barem Rabenhorst

**Título:** “Identificação genotípica e prevalência de cepas da *Helicobacter pylori* responsáveis pelo desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos: Estudos em lesões precursoras”

Eu, \_\_\_\_\_ por este meio, fui informado (a), em detalhes sobre o estudo intitulado: “Identificação genotípica e prevalência de cepas da *Helicobacter pylori* responsáveis pelo desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos: Estudos em lesões precursoras”. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo em questão pretende associar fatores genéticos e ambientais, que estão relacionados às doenças, de modo a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria denominada *Helicobacter pylori*. Para identificar esta bactéria, serão feitos estudos no laboratório, analisando o material coletado no momento da endoscopia. Cerca de 200 pacientes serão incluídos no presente estudo. Portanto, concordando em participar serei um dos pacientes deste estudo que envolve diversas instituições, permitindo coleta de material necessário para o estudo, bem como o uso de todo material gerando a partir desta coleta, como lâminas, blocos e etc. . Não haverá mudança ou perdas em relação à análise pelo patologista do meu material. Paralelamente, serão anotadas algumas questões referentes à minha pessoa, no que diz respeito a dados pessoais como a data de nascimento e hábitos de vida, como alimentação, ao consumo de bebida alcoólica e/ou cigarros e também em relação à minha doença, no que se refere aos sintomas e quando começou. Estas informações serão retiradas do meu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a mim. Minha participação não terá benefício direto imediato, em princípio, mas poderá estar contribuindo para que se entendam melhor os fatores de risco e alterações que ocorrem nas doenças gástricas. A identificação dos fatores de risco para doenças gástricas servirá para direcionar medidas preventivas. Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao meu prontuário. Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos onde recebo atendimento médico. Se tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a esse estudo ou aos meus direitos no que diz respeito à minha participação, posso contatar a Dra. Silvia Helena Rabenhorst no telefone 3288 8206 ou 9994 5689.

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Endereço do paciente: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome da testemunha \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura do investigador: \_\_\_\_\_

## Anexo – III

## Questionário de coleta de dados clínico – epidemiológicos



Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ N° Prontuário \_\_\_\_\_ código: \_\_\_\_\_  
Local da coleta \_\_\_\_\_ Amb: \_\_\_\_\_

**I – IDENTIFICAÇÃO**

Nome \_\_\_\_\_ Sexo F [ ] M [ ]

Endereço \_\_\_\_\_ Tel \_\_\_\_\_

naturalidade \_\_\_\_\_ Procedência \_\_\_\_\_ Ascendência \_\_\_\_\_

Cor: [ ] caucasiano [ ] negro [ ] asiático [ ] mestiço [ ] mulato: \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_ Nasc \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ABO \_\_\_\_ Profissão \_\_\_\_\_ Grau de instrução \_\_\_\_\_

**II-HISTÓRIA FAMILIAR:**

Familiares com história de gastrite \_\_\_\_\_

Familiares com história de câncer gástrico \_\_\_\_\_

**Hábitos:** [ ] Sal [ ] Frutas [ ] Verduras [ ] Churrasco ou Carne seca [ ] geladeira

[ ] Tabagista Tipo \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_ Fum. passivo [ ]

[ ] Álcool Tipo \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_

**III- DOENÇA ASSOCIADA:** \_\_\_\_\_

**IV- USO DE MEDICAMENTOS:** \_\_\_\_\_

**V- ENDOSCOPIA ANTERIOR:** [ ] Sim [ ] Não *H. pylori* [ ] Técnica \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Tratamento: \_\_\_\_\_

Biópsia : N° \_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Laudo \_\_\_\_\_

**VI-DADOS RELATIVOS À LESÃO ATUAL.** Teste de urease [ ]

Motivo da endoscopia (sintomas) \_\_\_\_\_

**VI-LAUDO ENDOSCÓPICO-** Médico \_\_\_\_\_

Esôfago: \_\_\_\_\_

Estômago: \_\_\_\_\_ Tipo de lesão \_\_\_\_\_ Sítio anatômico \_\_\_\_\_

Duodeno: \_\_\_\_\_

Conclusão \_\_\_\_\_

**VII- COLETA:** Região do corpo [ ] N° de fragmentos [ ] Região do antro [ ] N° de fragmentos [ ]

Tempo de ressecção da coleta: [ ] <1h [ ] 1h [ ] 2h [ ] 3h [ ] < ou =4h [ ]

Local Armazenamento: \_\_\_\_\_ Biópsia [ ] \_\_\_\_\_

Responsável pela Coleta: \_\_\_\_\_

