



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

**Associação entre *Helicobacter pylori* e Polimorfismos em Genes de Interleucinas no
Câncer Gástrico**

DÉBORA MENEZES DA COSTA

Fortaleza-CE

2012



DÉBORA MENEZES DA COSTA

**Associação entre *Helicobacter pylori* e Polimorfismos em Genes de Interleucinas no
Câncer Gástrico**

**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 Mestre em Microbiologia Médica**

Orientadora: Professora Dr^a. Sílvia Helena Barem Rabenhorst

Fortaleza-CE

2012



DÉBORA MENEZES DA COSTA

**Associação entre *Helicobacter pylori* e Polimorfismos em Genes de Interleucinas no
Câncer Gástrico**

Banca Examinadora

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

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
Universidade São Francisco – UNIFAG

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profa. Dra. Roberta Barroso Vasconcelos
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

**À minha mãe, minha avó,
minha família,
por todo apoio e incentivo
Dedico**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar no caminho certo e não me deixar cair nos momentos de angústia. Por Sua eterna presença em minha vida;

A minha mãe Diana Tavares e a minha avó Ana Tavares, pela imensa dedicação à minha formação como pessoa, por todo amor e carinho, e pelos inúmeros bons conselhos;

A Wanderley Marques, por todo incentivo e por ficar sempre na torcida pelo 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;

A CAPES pelo suporte financeiro;

Aos pacientes incluídos nesse estudo e seus familiares;

A professora Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pela dedicada orientação, confiança e paciência;

A Profa. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, por todas as análises anátomo-patológicas e histológicas dos tumores;

Ao Hospital Universitário Walter Cantídeo, à Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza e ao Hospital Geral Cesar Cals por nos permitir o acesso para a execução desse estudo;

Aos participantes da banca, pela presteza em aceitar o convite, pela cuidadosa leitura e pelas valiosas contribuições;

Ao Cirurgião Marco Aurélio Pessoa Barros, pela contribuição no desenvolvimento desse estudo;

A Dra. Rita de Cássia Barbosa, por sua agradável presença e por sempre nos proporcionar momentos maravilhosos com os quitutes de sua mãe;

A doutoranda Valeska Portela Lima, por sua dedicação à pesquisa e por se disponibilizar sempre a ajudar, compartilhando sua experiência e conhecimento com todos;

A doutoranda Isabelle J.L. Silva Fernandes, por seu bom-humor e dedicação à pesquisa, por todas as caronas, conversas e reflexões sobre a vida;

A doutoranda Markênia Kélia Santos Alves, por sua alegria e por ser um exemplo de dedicação à pesquisa e disposição de trabalhar horas a fio;

A Ms. Ana Paula Santos do Carmo, por sua garra, determinação e dinamismo, mostrando que sempre é possível fazer muitas coisas ao mesmo tempo;

A mestranda Francivandi Coelho Barbosa, por ser além de companheira de disciplinas, amiga de todas as horas;

A mestranda Érica Hardy Lemos, por todo seu dinamismo e dedicação à pesquisa, por todas as suas histórias contadas, sempre nos fazendo rir e nos contagiando com sua alegria;

A Eduardo H.C. Neves Filho, por ter compartilhado vários momentos desde quando nós dois éramos alunos de iniciação científica, por sua ajuda com a língua inglesa e por seus cafés sempre vindos em boa hora;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, Tatiana Dantas, Denise Cordeiro, Ana Patrícia Vieira, Pedro Bessa, Igor Menezes, Rogério Malveira, Lia Pinto, Sâmia pelo apoio e pela convivência sempre agradável;

Aos meus colegas de mestrado, Paula Brito, Mariana Arruda, Thially Gonçalves, Kylvia Rocha e Hermínio Benitez, por terem compartilhado todas dificuldades e as terem minimizado o quanto foi possível.

*Necessitamos sempre de ambicionar
alguma coisa que, alcançada,
não nos torna sem ambição.*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O papel carcinogênico de *Helicobacter pylori* está relacionado à sua capacidade de promover a inflamação e, como consequência, a metilação do DNA, característica epigenética frequentemente associada à carcinogênese gástrica. Por sua vez, o processo inflamatório pode ser modulado pela presença de alguns dos polimorfismos presentes em genes de interleucinas, bem como pelo genótipo bacteriano. Assim, os objetivos desse estudo foram: a) associar o perfil genotípico de virulência de *H. pylori* (quanto aos genes *cagA*, *cagE*, *vacA* e *virB11*) e o perfil genotípico dos polimorfismos de interleucinas pró-inflamatórias, IL1 β -511 C/T, IL1RN, IL6 -174 G/C e TNF -308 G/A com a metilação de promotores gênicos de *CDKN2A*, *MLH1* e *COX-2*; b) verificar a associação dos polimorfismos da IL6 -174 G/C e TNF -308 G/A com genótipo bacteriano no desenvolvimento do câncer gástrico, considerando os aspectos clinico-patológicos. Para isso, foi extraído DNA a partir de 125 amostras tumorais, coletadas de pacientes submetidos à gastrectomia em hospitais de Fortaleza – Ceará – Brasil. A genotipagem dos polimorfismos foi feita por PCR-RFLP e a análise de metilação, por MS-PCR. Os genes de virulência de *H. pylori* foram analisados por PCR. Em algumas análises, os genótipos bacterianos foram agrupados de acordo com os alelos de *vacA* e a integridade de *cag*-PAI. Neste estudo, foi verificado que nos tumores da cárdia a metilação na região promotora de *COX-2* estava associada ao alelo IL1RN*2 ($p=0,015$), e o genótipo IL-1B -511 T + IL1RN*2 se mostrou importante para a metilação desse gene ($p=0,013$), principalmente na presença de cepas de *H. pylori* *cagA*+ ($p=0,026$) e *vacA* *s1* ($p=0,025$). A combinação genotípica IL6 CC+TNFGG parece estar envolvida na não-metilação dos promotores dos genes *CDKN2A* ($p=0,046$) e *MLH1* ($p=0,031$), mesmo na presença da infecção por cepa *H. pylori* *cagA*+. Considerando os aspectos clinico-patológicos, uma correlação positiva foi encontrada entre o gênero masculino e pacientes da faixa etária ≥ 65 anos ($r=0,198$; $p=0,037$), na qual esse gênero foi predominante (77,5%; $p=0,022$). Além disso, também foi encontrada correlação positiva entre o gênero feminino e a faixa etária de 55-64 ($r=+0,217$; $p=0,021$). Quanto ao subtipo histológico, foi visto que tumores difusos estavam correlacionados a pacientes mais jovens (15-44 anos, $r=+0,207$; $p=0,033$), enquanto o subtipo intestinal, a pacientes de mais idade (≥ 65 anos, $r=+0,296$; $p=0,017$). Tumores do subtipo difuso foram correlacionados com o gênero feminino e aqueles do subtipo intestinal, com o gênero masculino ($r=+0,226$; $p=0,019$). Quanto aos polimorfismos de interleucinas, o alelo C do polimorfismo IL6 -174G/C foi correlacionado negativamente com pacientes de menor faixa etária ($r=-0,193$; $p=0,041$), sendo o que pacientes com genótipo CC de IL6 foi associado com a infecção por cepas virulentas (grupo 1c) ($r=+0,225$; $p=0,017$); enquanto que pacientes portadores do genótipo heterozigoto IL6 -174 GC, com cepas virulentas (grupo 1c) ($r=-0,215$; $p=0,023$) e de menor virulência (grupo 2c) ($r=+0,204$; $p=0,031$). Os achados desse estudo contribuem com o estabelecimento de um perfil genotípico envolvido na metilação de alguns genes, no qual pacientes com genótipo mais inflamatório e infectados por cepas de *H. pylori* mais virulentas estão associadas a uma maior taxa de metilação de alguns genes envolvidos na carcinogênese gástrica, podendo também variar de acordo com a localização e o subtipo do tumor. Esse estudo, portanto, oferece uma contribuição relevante no que diz respeito à associação da cepa de *H. pylori* com polimorfismos de interleucinas, no qual cepas

de maior virulência parecem estar relacionadas com a infecção de pacientes com genótipos menos inflamatórios, sendo o contrário também verdadeiro.

Palavras-chave: câncer gástrico; *Helicobacter pylori*; interleucinas; polimorfismo genético; metilação

ABSTRACT

The carcinogenic role of *Helicobacter pylori* is related to its ability to promote inflammation and, consequently, DNA methylation, epigenetic trait often associated with gastric carcinogenesis. In turn, the inflammation can be modulated by the presence of polymorphisms in some interleukin genes, as well as the bacterial genotype. The objectives of this study were: a) link the genotypic profile of *H. pylori* virulence (*cagA*, *cagE*, *vacA* and *virB11* genes) and genotypic profile of pro-inflammatory interleukins polymorphisms, IL1 β -511 C/T, IL1RN, IL6 -174 G/C and TNF-308 G/A with gene promoter methylation of *CDKN2A*, *MLH1*, and *COX-2* b) verify the association of polymorphisms of IL6 -174 G/C and TNF -308 G/A with bacterial genotype in the gastric cancer development, considering the clinical and pathological aspects. For this, DNA was extracted from 125 tumor samples, collected from patients who underwent gastrectomy at hospitals in Fortaleza – Ceará – Brazil. Polymorphisms genotyping were identified by PCR-RFLP and methylation analysis by MS-PCR. Virulence genes of *H. pylori* were analyzed by PCR. In some analyzes, the bacterial genotypes were grouped according to the alleles of *vacA* and integrity of *cag*-PAI. In this study, we observed that in cardia tumors the methylation of *COX-2* promoter region was associated with IL1RN*2 allele ($p=0.015$), and genotype IL-1B -511T+IL1RN*2 was important to methylation of this gene ($p=0.013$), especially in the presence of *H. pylori cagA*+strains ($p=0.020$) and *vacA s1* ($p=0.032$). The genotype combination IL6 CC+TNFGG seems to be involved in non-methylation of promoters of genes *CDKN2A* ($p=0.046$) and *MLH1* ($p=0.031$), even in the presence of infection by strain *H. pylori cagA*+. Considering the clinical and pathological aspects, a positive correlation was found between males and patients aged ≥ 65 years ($r=0.198$, $p=0.037$), in which this gender was predominant (77.5%, $p=0.022$). In addition, positive correlation was found between female and patients aged 55-64 years ($r=+0.217$, $p=0.021$). Regarding the histologic subtype, we found that diffuse tumors were correlated with younger patients (15-44 years, $r=+0.207$, $p=0.033$), while the intestinal subtype, with the older patients (≥ 65 years, $r=+0.296$, $p=0.017$). Tumors of the diffuse subtype were correlated with female gender and those of the intestinal subtype, with males ($r=+0.226$, $p=0.019$). Regarding polymorphisms of interleukins, the C allele of IL6 polymorphism -174G/C was negatively correlated with the younger group ($r=-0.193$, $p=0.041$), and the patients with CC genotype of IL6 was associated with infection by virulent strains (group 1c) ($r=+0.225$, $p=0.017$), whereas patients with the genotype IL6 -174 GC, with virulent strains (group 1c) ($r=-0.215$, $p=0.023$) and less virulent (group 2c) ($r=+0.204$, $p=0.031$). Our findings contribute to the establishment of a genotypic profile involved in methylation of some genes in which patients with genotype more inflammatory and infected with strains of *H. pylori* more virulent are associated with a higher rate of methylation of some genes involved in gastric carcinogenesis and may also vary according to location and tumor subtype. This study thus provides an important contribution with regard to the association of the strain of *H. pylori* polymorphisms interleukins, in which most virulent strains appear to be related to infection of patients with inflammatory genotypes less, and the converse is also true.

Keywords: gastric cancer, *Helicobacter pylori*, interleukins, genetic polymorphism, methylation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de incidência mundial de câncer gástrico a cada 100.000 pessoas.....	13
Figura 2 - Taxas brutas de incidência de câncer gástrico por 100.000 homens [a] ou mulheres [b] estimadas para o ano 2012 no Brasil.....	13
Figura 3 - Sítios anatômicos do estômago.....	14
Figura 4 - Classificação histopatológica de Lauren.	15
Figura 5 - Representação esquemática da Cascata de Correa..	18
Figura 6 - <i>Helicobacter pylori</i>	19
Figura 7 - Ilha de patogenicidade cag, composta por aproximadamente 37 kb e 29 genes.	21
Figura 8 - Modelo do sistema de secreção tipo IV de <i>Helicobacter pylori</i>	22
Figura 9 - Polimorfismo no gene vacA de <i>Helicobacter pylori</i>	23
Figura 10 - Efeitos de VacA nas células epiteliais gástricas.	24
Figura 11 - Receptores Toll-like (TLRs) e o reconhecimento de patógenos.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

Cag-PAI	Ilha de patogenicidade <i>cag</i>
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
DC	Células Dendríticas
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator de Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMN	Célula Polimorfonuclear
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SST4	Sistema de Secreção Tipo IV
Th1	Células T auxiliares (helper) 1
Th2	Células T auxiliares (helper) 2
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Células T regulatórias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Câncer Gástrico	13
1.1.1 Epidemiologia	13
1.1.2 Características Histopatológicas	14
1.1.3 Etiologia	17
1.2 <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.2.2 <i>Helicobacter pylori</i> e o Câncer Gástrico	20
1.2.3 Fatores de Virulência	20
1.3 Colonização por <i>Helicobacter pylori</i> e Resposta Imune do Hospedeiro	24
1.4 Polimorfismos de Interleucinas	27
1.4.1 Interleucina 1 Beta (IL1 β)	27
1.4.2 Receptor Antagonista de Interleucina 1 (IL1RN)	27
1.4.3 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF)	28
1.4.4 Interleucina 6 (IL6)	29
1.5 Polimorfismos de Interleucinas no Câncer Gástrico	30
1.6 Inflamação e Metilação de Promotores no Câncer Gástrico	31
1.7 Perguntas de Partida	33
1.8 Hipóteses de Trabalho	33
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
REFERÊNCIAS	35
3. ARTIGO I	47
4. ARTIGO II	69
ANEXOS	89
Anexo – I Protocolo de Coleta no Centro cirúrgico	90
Anexo –II Parecer do Comitê de Ética Anexo - III	91
Anexo - III Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	92
Anexo – IV Cadastro de Pacientes Submetidos à Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica ...	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Gástrico

1.1.1 Epidemiologia

Os tumores de estômago constituem o quarto tipo de câncer mais freqüente no mundo, representando 7,8% de todos os diagnósticos, e são a segunda causa de morte por câncer em ambos os sexos. Dessa forma, esses tumores representam um grave problema de saúde pública (WEN e MOSS, 2009), possuindo freqüência duas vezes maior em homens que em mulheres (FERLAY et al., 2008).

As taxas de incidência de câncer gástrico variam de acordo com a região do mundo (Figura 1), sendo maiores em países do leste asiático, principalmente a China, bem como nos países das Américas Central e do Sul. Estima-se que cerca de 70% dos novos casos e mortes ocorrerão em países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2008).

No Brasil, as taxas de incidência também variam regionalmente e, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a taxa de mortalidade é de cerca de 87,22/100.000 casos. O Ceará está entre os estados que possui uma das maiores taxas de incidência, sendo estimados 15,26/100.000 novos casos entre os homens e 8,97/100.000 casos entre as mulheres (Figura 2) (INCA, 2011).

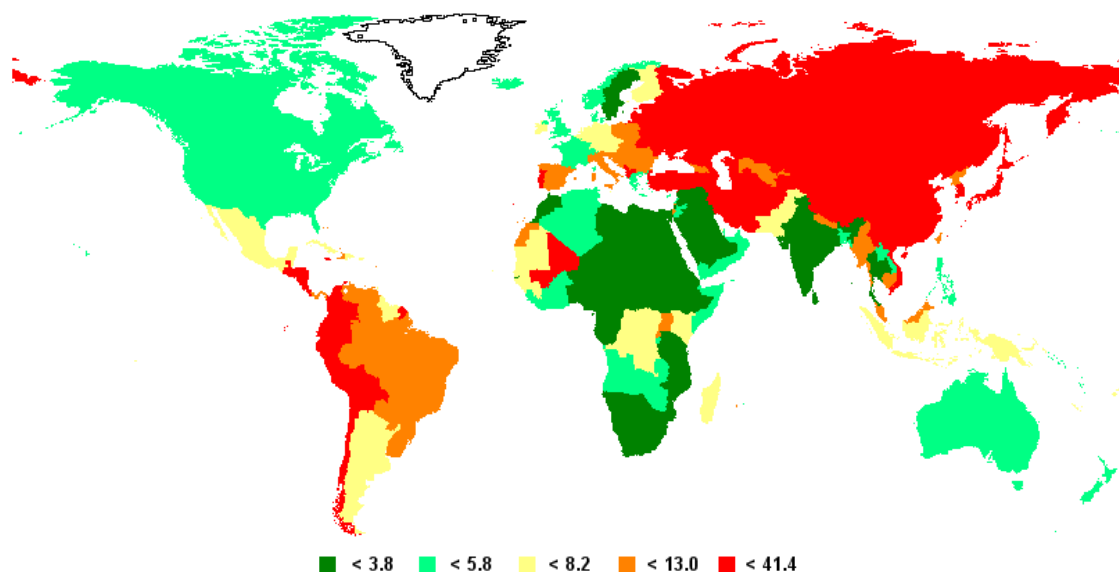


Figura 1 - Taxa de incidência mundial de câncer gástrico a cada 100.000 pessoas. Fonte: GLOBOCAN - *Cancer Incidence and Mortality Worldwide* (FERLAY et al., 2008).

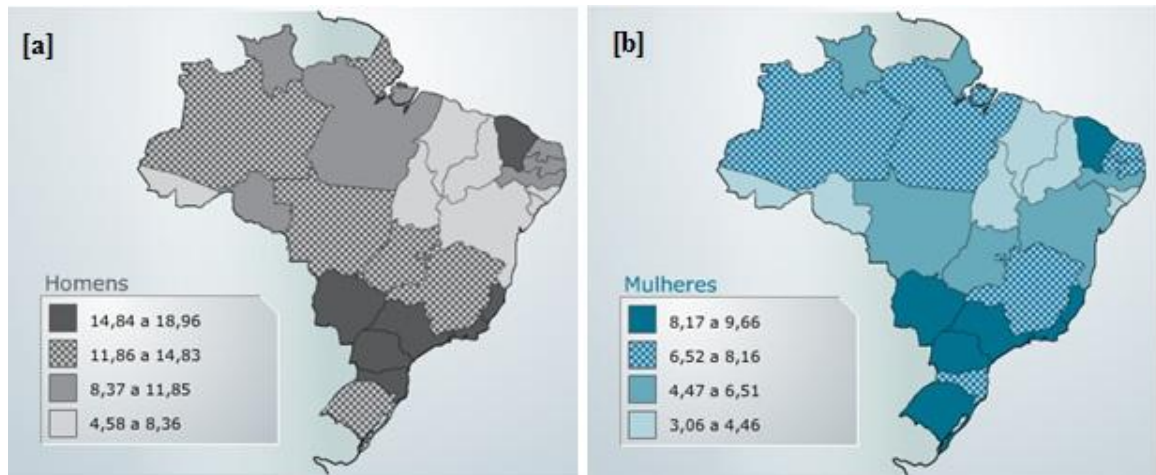


Figura 2 - Taxas brutas de incidência de câncer gástrico por 100.000 homens [a] ou mulheres [b] estimadas para o ano 2012 no Brasil. Fonte: INCA – Instituto Nacional do Câncer (2011).

1.1.2 Características Patológicas

Os tumores gástricos podem ser encontrados na região proximal (cárdia, fundo), no corpo e na porção distal (antro, piloro) do estômago (Figura 3). Diferenças entre tumores localizados na cárdia e na região não-cárdia sugerem que eles representam doenças distintas com etiologias diferentes. Além disso, o prognóstico dos tumores da cárdia é menos favorável quando comparado àqueles tumores em outros sítios anatômicos (KONTUREK et al., 2006).

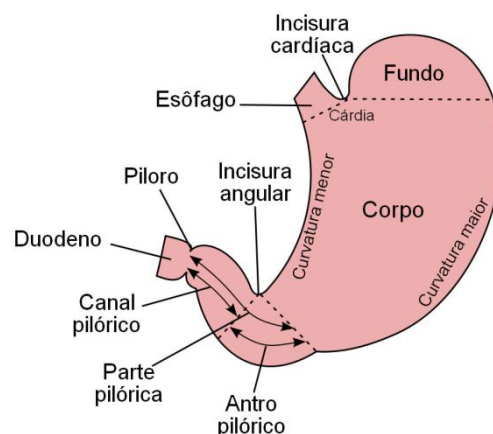


Figura 3 - Sítios anatômicos do estômago. Fonte: Wikipedia.

A classificação histológica do câncer gástrico divide esses tumores em dois tipos principais: não-epiteliais e epiteliais. Dentre os tumores epiteliais, estão incluídos os adenocarcinomas, que representam 90-95% dos casos de tumor gástrico (CORREIA et al., 2009). Uma das classificações mais utilizadas para este tumor é a classificação de Lauren, que se baseia em aspectos histopatológicos e clínicos, dividindo-o em dois subtipos: intestinal e difuso (Figura 4) (LAUREN, 1965).

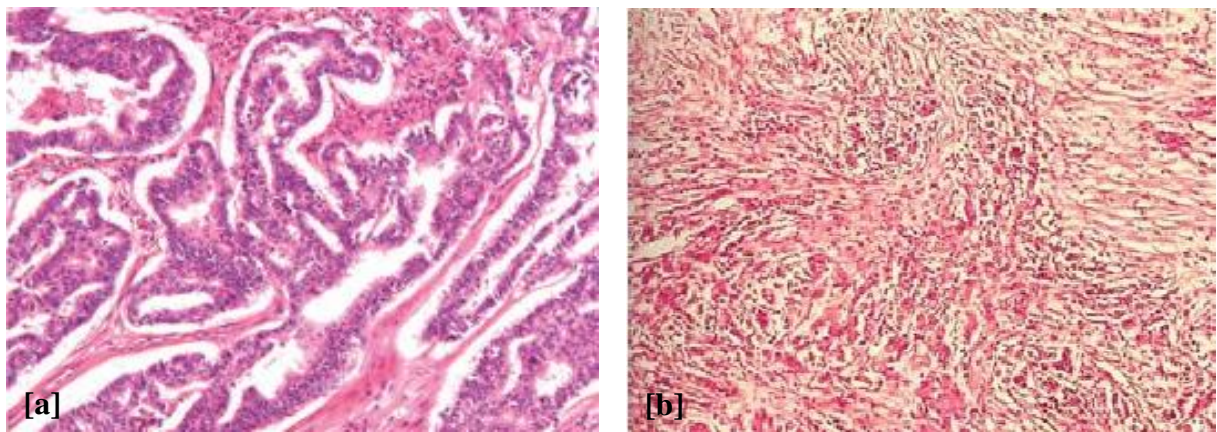


Figura 4 - Classificação histopatológica de Lauren. Adenocarcinomas dos tipos [a] Intestinal [Fonte: Hartgrink et al. (2009)] e [b] Difuso [Fonte: Espejo e Navarrete (2003)] corados por HE (x400).

Os tumores do tipo intestinal são predominantemente encontrados em homens e em indivíduos mais velhos, são dependentes de fatores ambientais e podem estar associados à presença de lesões pré-malignas, que representam passos intermediários no desenvolvimento da neoplasia. Tais tumores são os mais frequentes e, em geral, se apresentam moderadamente ou bem diferenciados, mostrando microscopicamente um padrão glandular semelhante à mucosa intestinal, com células coesas que formam estruturas tubulares, comumente acompanhado por formação papilar ou componentes sólidos (Figura 4a) (WU et al., 2006).

Já os tumores difusos acometem com mais frequência pacientes jovens e do sexo feminino, podendo apresentar um caráter hereditário. Esses tumores são pouco diferenciados, têm prognóstico ruim e não estão associados à lesões pré-malignas (KOKKOLA e SIPPONEN, 2001; LIM et al., 2003; CARNEIRO et al., 2004). Microscopicamente, consistem em células pobremente coesivas resultando em pequenos grupos ou mesmo em células tumorais solitárias, sem formação de estruturas glandulares, apresentando algumas vezes um vacúolo citoplasmático claro (Figura 4b) (HARTGRINK et al., 2009). Geograficamente, os adenocarcinomas do tipo difuso são mais comumente encontrados em

áreas de baixa incidência, enquanto os do tipo intestinal são predominantes em áreas de alta incidência (HAMILTON e AALTONEN, 2000).

Outro parâmetro histopatológico é o estadiamento do tumor. Existem dois sistemas principais usados para classificar o estadiamento do câncer gástrico: o da "*Japanese Classification of Gastric Cancer*" (JCGC) e o Tumor-Nodo-Metástase (TNM) da "*International Union Against Cancer*" (UIAC) (HARTGRINK et al., 2009). Na classificação patológica pTNM são avaliados parâmetros como a profundidade do tumor (T), a presença de linfonodos comprometidos (N) e a presença de metástases à distância (M), como mostrado na Tabela 1 (WERNER et al., 2001).

Tabela 1 - Definição do TNM patológico.

Tumor Primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
T2a	Tumor invade a muscular própria
T2b	Tumor invade subserosa
T3	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
N2	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais
Metástase à distância (pM)	
MX	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Sem metástase à distância
M1	Com metástase à distância

Traduzido de IARC (2000).

Baseado nesta classificação, é estabelecido o estadiamento do tumor, que pode ser classificado em quatro estádios (I - IV). Os estádios I e II podem ser agrupados como de baixo grau, enquanto III e IV são denominados de alto grau, os quais compreendem cerca de 65% de todos os tumores e apresentam um pior prognóstico (Tabela 2) (WERNER et al., 2001).

Tabela 2 – Estadiamento por agrupamento de classificações histológicas.

Estadiamento	Combinações TNM		
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N0	M0
II	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T3	N2	M0
IV	T4	N1-3	M0
	T1-3	N3	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

Traduzido de IARC (2000).

1.1.3 Etiologia

Vários são os fatores etiológicos possivelmente envolvidos na tumorigênese gástrica. Estudos epidemiológicos sugerem que fatores genéticos e ambientais tenham um importante papel no desenvolvimento desse câncer (ANDO et al., 2006; YANG et al., 2009; PAKSERESHT et al., 2011).

Dentre os fatores genéticos, destacam-se aqueles responsáveis pelos casos hereditários de câncer gástrico, associados à 5% de todos os casos (BARBER et al., 2006), como por exemplo a mutação do gene da E-caderina (*CDH1*). Nas famílias com mutação do gene *CDH1*, o câncer gástrico foi identificado em 76,5 – 100% de espécimes obtidos a partir gastrectomias profiláticas (HUNTSMAN et al., 2001; LYNCH et al., 2008). Alterações nesse gene são reportadas não somente em casos hereditários, mas também em tumores gástricos primários, nos quais o promotor de *CDH1* se encontra hipermetilado em 40-80% casos (GRAZIANO et al., 2003).

Dentre os fatores ambientais, pode-se destacar:

- Consumo elevado de sal, que através da destruição da camada mucosa gera inflamação, erosões e degeneração epitelial (GLADE, 1999; LIU e RUSSELL, 2008);
- Consumo excessivo de álcool, embora sua associação não tenha sido demonstrada (FRANKE et al., 2005);
- Tabagismo (LADEIRAS-LOPES et al., 2008);

- Infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, um dos principais fatores ambientais causadores de câncer gástrico (WEN e MOSS, 2009).

H. pylori está envolvida na etiologia de doenças gástricas, tendo sua participação comprovada somente no ano de 1983, por Robin Warren e Barry Marshall, que ganharam o Prêmio Nobel em 2005 por essa descoberta. (WARREN e MARSHALL, 1983). A infecção por essa bactéria está relacionada a carcinogênese de tumores do subtipo intestinal, como proposto por Correa (1992). Esse processo é inicialmente dirigido pela infecção por *H. pylori*, causando uma sequência de lesões precursoras caracterizadas por uma cascata de mudanças na mucosa gástrica que progredem a partir da mucosa normal (Figura 5).

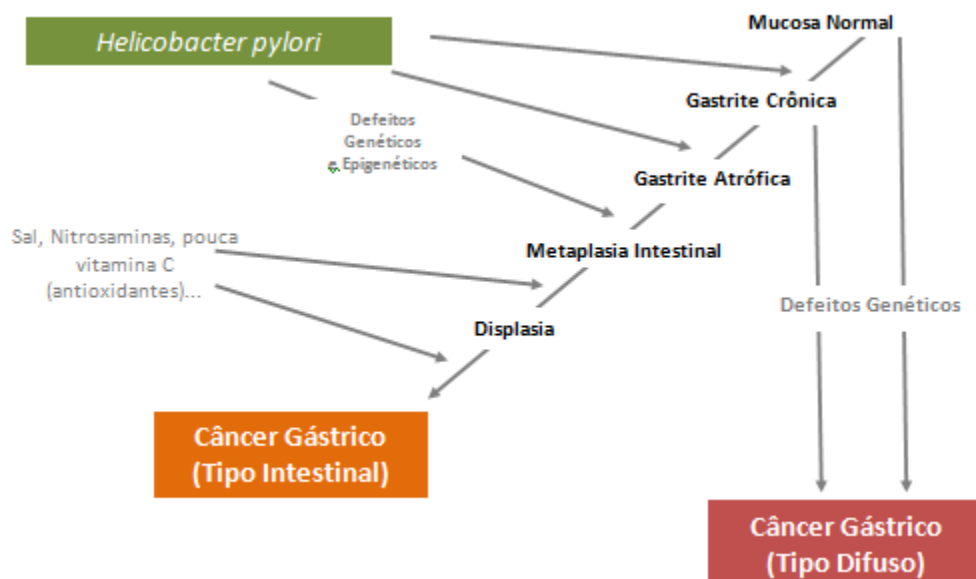


Figura 5 - Representação esquemática da Cascata de Correa. Modelo sequencial de alterações, com a progressão a partir da mucosa normal, evoluindo para gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e, por fim, o câncer gástrico do tipo intestinal. Adaptado de Correa (1992).

1.2 *Helicobacter pylori*

É uma bactéria encontrada com maior frequência na forma espiralada ou encurvada, também podendo assumir a forma de cocos, gram-negativa, móvel, microaerófila, que possui de 4-6 flagelos unipolares embainhados e que apresenta de 0,5 a 0,9 µm de largura

e 2 a 4 μm de comprimento. Essa espécie está classificada no Domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Epsilonproteobacteria, na ordem Campylobacterales, na família Helicobacteraceae e no gênero *Helicobacter* (GOODWIN, et al., 1989; MONTECUCCO e RAPPUOLI, 2001; OWEN, 2001; NCBI).

H. pylori coloniza áreas do estômago e duodeno (WARREN e MARSHALL, 1983) e sobrevive muito bem neste ambiente ácido devido à secreção de urease. Essa enzima converte a uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, em amônia e bicarbonato promovendo a alcalinização local e resultando no aumento do pH periplasmático e do microambiente próximo (Figura 6). A elevação do pH previne o acúmulo tóxico de uréia dentro da bactéria e protege esse patógeno dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago (TOMBOLA et al., 2001; YAMAOKA, 2008).

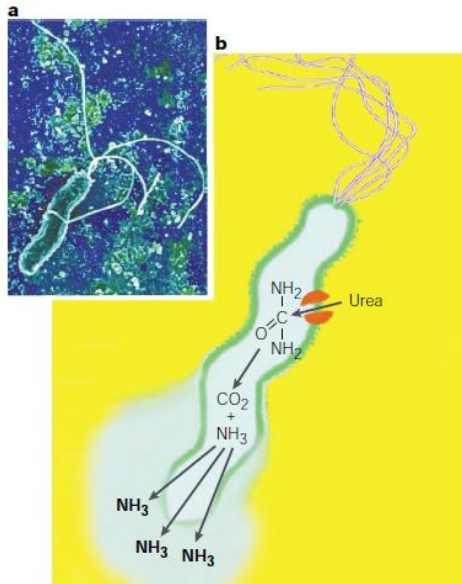


Figura 6 - *Helicobacter pylori* a) Micrografia eletrônica b) Representação esquemática mostrando a forma, flagelo polar, urease, canal de uréia e a produção de amônia (NH_3), a qual neutraliza o ambiente ácido em amarelo, o citosol e o ambiente imediatamente ao redor da bactéria (azul). Fonte: Montecucco e Rappuoli (2001).

Acredita-se que há centenas de anos *H. pylori* venha coexistindo com a espécie humana. Tem-se hipotetizado que a colonização por essa bactéria pode ter proporcionado benefícios àqueles que a possuíam, funcionando como uma pressão seletiva durante um longo período de tempo (BLASER e ATHERTON, 2004).

H. pylori possui uma distribuição cosmopolita, sendo encontrada em habitantes de todos os continentes (GO, 2002). Admite-se que a infecção ocorre durante a infância e embora as vias de transmissão não sejam completamente entendidas, são aceitas as seguintes: (1) via fecal-oral, característica de países em desenvolvimento, na qual a água poderia ser o veículo; e (2) via gastro-oral e oral-oral, prevalente em países desenvolvidos (SHANKS e EL-OMAR, 2009; KHALIFA et al., 2010). A prevalência da infecção por *H. pylori* varia de acordo com a idade (quanto maior a idade maior a prevalência), o nível socioeconômico (maior em países em desenvolvimento) e a etnia (LOGAN e WALKER, 2001).

1.2.2 *Helicobacter pylori* e o Câncer Gástrico

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou *H. pylori* como um carcinógeno de classe I (definitivo), baseando-se em evidências epidemiológicas sobre seu papel na patogênese dos adenocarcinomas gástricos (IARC, 1994). Embora cerca de 50% da população mundial esteja infectada por essa bactéria, estima-se que somente 1-2% dessas pessoas irão desenvolver câncer gástrico (WEN e MOSS, 2009). Essa discordância entre as taxas de infecção e desenvolvimento da doença é devida a diferenças entre as cepas envolvidas nas infecções (presença de fatores de virulência), bem como entre os hospedeiros humanos (fatores genéticos e ambientais) (GLADE, 1999; HUANG et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2008; LIMA et al., 2011).

1.2.3 Fatores de Virulência

Alguns fatores de virulência de *H. pylori* são frequentemente associados a doenças gástricas mais graves. Estudos mostram que a presença da ilha de patogenicidade Cag (*cag*-PAI), bem como da variação alélica do gene *vacA*, estão relacionadas ao desenvolvimento de câncer gástrico (CENSINI et al., 1996; ENROTH et al., 2000; DOURAGHI et al., 2009).

a) Ilha de Patogenicidade *cag* (*cag*-PAI)

cag-PAI (Figura 7) constitui uma região gênica de *H. pylori* de 37 kb, composta por aproximadamente 29 genes que codificam o sistema de secreção tipo IV (SST4), utilizado pela bactéria para a transferência de produtos bacterianos para a célula hospedeira, incluindo a

proteína CagA (SUERBAUM e JOSENHANS, 2007). Tais produtos injetados via SST4 permitem que a bactéria module vias do metabolismo da célula hospedeira (COVACCI e RAPPUOLI, 2000).

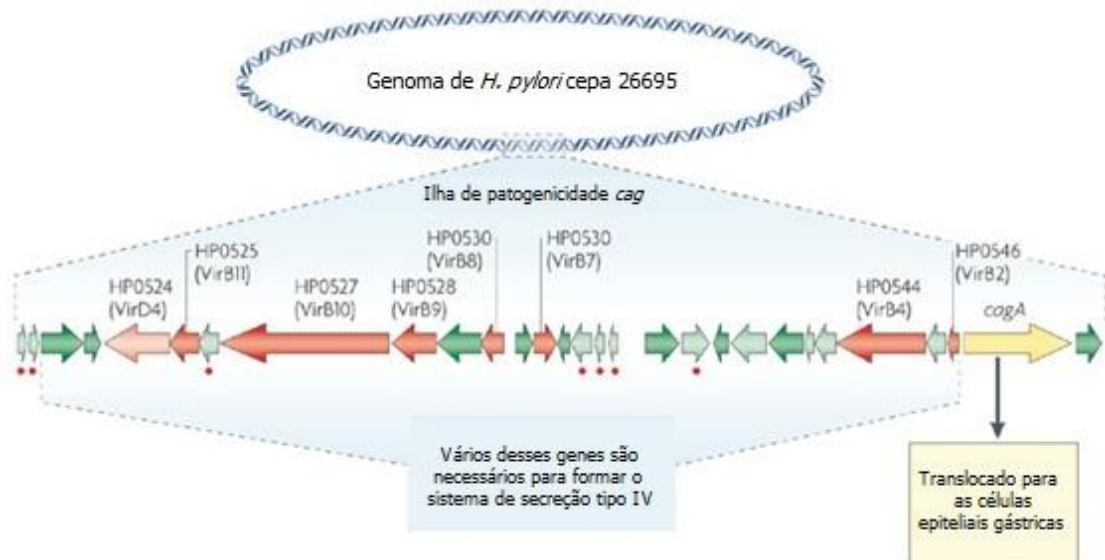


Figura 7 - Ilha de patogenicidade *cag*, composta por aproximadamente 37 kb e 29 genes. As proteínas codificadas pelos genes da ilha estão envolvidas em dois processos principais: a indução da produção de interleucina-8 (IL-8) pelas células epiteliais gástricas e a translocação de CagA da bactéria para a célula do hospedeiro. Todos os genes representados por setas em tons escuros de vermelho e verde indicam genes que são essenciais para indução de IL-8; considerando os tons mais claros de vermelho e verde, indicam os genes que não estão envolvidos neste processo. As setas marcadas com um ponto vermelho indicam os genes que não são necessários para a translocação de CagA, os genes não marcados, são essenciais para a translocação. Traduzido de Suerbaum e Josenhans (2007).

Gene *cagA* – localizado na porção direita da ilha, é um marcador de *cag*-PAI, que codifica uma proteína (CagA) de 125-145 kDa injetada nas células epiteliais gástricas quando ocorre sucesso da infecção por *H. pylori*. Essa proteína atua como um antígeno altamente imunogênico, que leva a mudanças morfológicas na célula hospedeira (fenótipo *hummingbird*). A proteína CagA, além de mudanças na estrutura celular, também é responsável pela desregulação da polaridade e da proliferação celular, do processo mitótico, agindo como uma engrenagem na desregulação de múltiplas vias de sinalização celular (MURATA-KAMIYA, 2011). Estudos em roedores mostraram que os animais infectados com cepas de *H. pylori* do tipo selvagem (que possuía *cagA* sem alterações) desenvolveram câncer gástrico, diferentemente daqueles infectados por cepas com *cagA* mutante (FRANCO et al., 2005; 2008). Nos países ocidentais, tem sido reportado que indivíduos infectados com

cepas de *H. pylori* que possuem o gene *cagA* têm um maior risco de desenvolver úlcera péptica e câncer gástrico, que aquelas infectadas com cepas *cagA* negativas (VAN DOORN et al., 1998; YAMAOKA et al., 2002). Já nos países do leste asiático, a maioria das cepas de *H. pylori* possui o gene *cagA*, não havendo uma associação clara com alguma doença (YAMAOKA et al., 1999).

Gene *cagE* (*virB4*) – também localizado na porção direita de *cag*-PAI, é considerado um melhor marcador de integridade da ilha de patogenicidade que os outros genes *cag* (IKENOUE et al., 2001; SOZZI et al., 2005). Este gene codifica uma proteína transmembrana constituinte do SST4 (Figura 8), localizada na membrana interna da bactéria, com função de ATPase, que fornece energia para a montagem do sistema e/ou transporte de substâncias (KUTTER et al., 2008). Além disso, essa proteína é responsável pela indução da secreção de interleucina 8 (IL-8) pelas células epiteliais gástricas (TUMMURU et al., 1995).

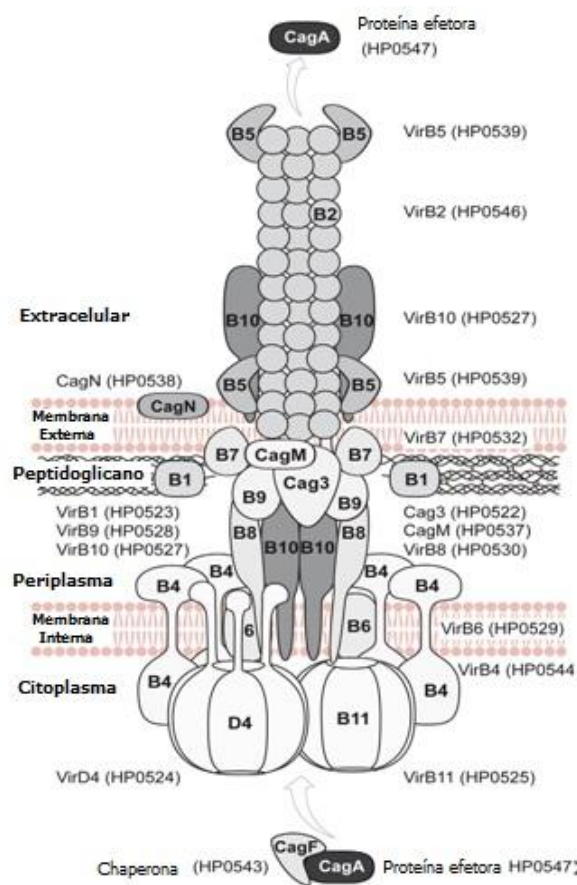


Figura 8 - Modelo do sistema de secreção tipo IV de *Helicobacter pylori*. Cada componente do sistema de secreção codificado por *cag*-PAI demonstrado em cinza. Traduzido de Olbermann et al. (2010).

Gene *virB11* – localizado na porção esquerda de *cag*-PAI, este gene codifica uma proteína essencial para a translocação de CagA (FISCHER et al., 2001). Ele também faz parte do SST4 e possui uma estrutura anelar composta de seis unidades monoméricas, exibindo função de ATPase (Figura 8) (FRONZES et al., 2009).

b) Citotoxina Vacuolizante A (*vacA*)

O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori* e compreende duas partes variáveis, *s* (localizada no final da cadeia 5' do DNA) e *m* (localizada na região média). Essas duas regiões possuem alelos variáveis: *s* (*s1* ou *s2*) e *m* (*m1* ou *m2*), e a combinação em mosaico desses alelos determina a toxicidade da proteína produzida (Figura 9). Cepas portadoras do genótipo *s1m1* produzem uma proteína que é tóxica para uma maior variedade de tipos celulares, que aquelas *s1m2*. Já as cepas *s2m1* são raras e o produto de cepas *s2m2* virtualmente não possui toxicidade (PAGLIACCIA et al., 1998; LETLEY et al., 2003).

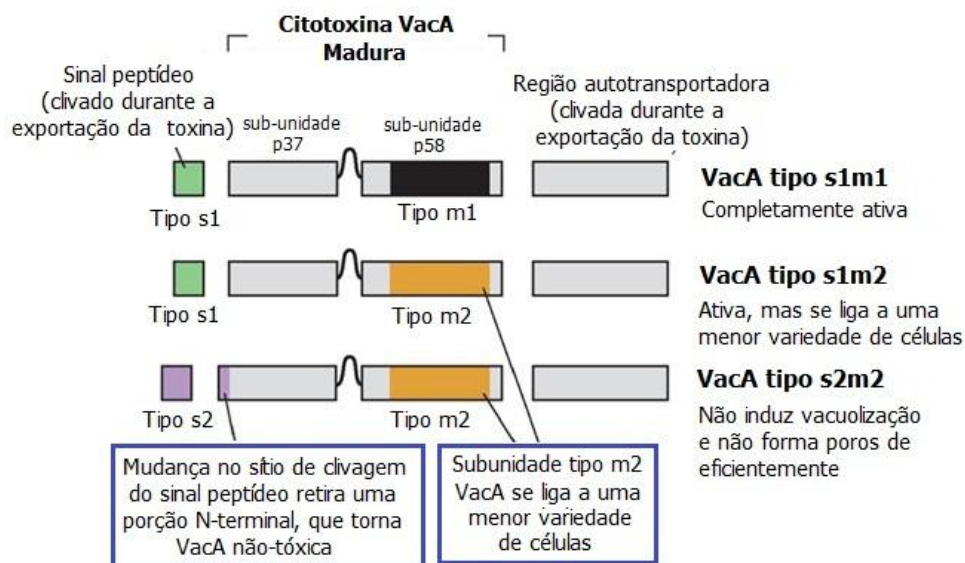


Figura 9 - Polimorfismo no gene *vacA* de *Helicobacter pylori*. O gene *vacA* possui variações nas regiões sinal (*s1* e *s2*) e média (*m1* e *m2*), normalmente originando dessas combinações três tipos de toxinas: *s1m1*, *s1m2* e *s2m2* (o tipo *s2m1* é raro). Traduzido de Atherton (2006).

A proteína VacA é secretada no espaço extracelular e é internalizada por endocitose pela célula do hospedeiro. Esta citotoxina induz várias atividades celulares, incluindo a formação de poros nas membranas citoplasmática e mitocondrial, bem como o

efluxo de citocromo c, que aumenta a permeabilidade celular, levando à apoptose. Essa proteína também interfere na fagocitose, na apresentação de antígenos, além de inibir especificamente a ativação e a proliferação de células T (Figura 10) (SUNDRUD et al., 2004; BASSO et al., 2010).

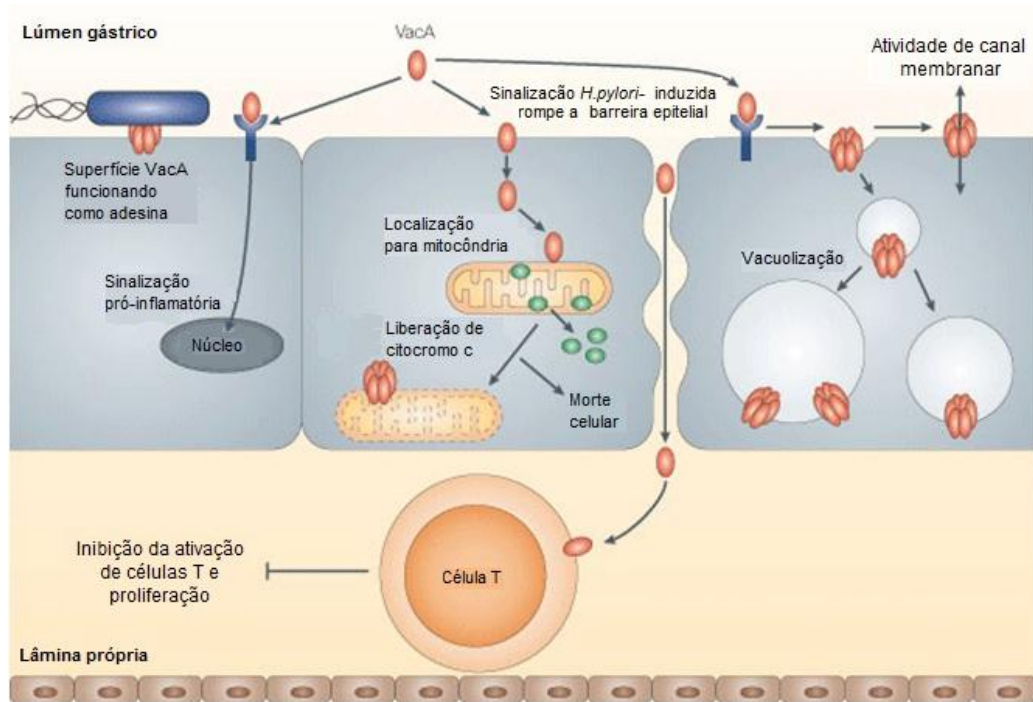


Figura 10 - Efeitos de VacA nas células epiteliais gástricas. Alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e apoptose, estimulação da sinalização pró-inflamatória, aumento da permeabilidade da membrana plasmática e alterações nos compartimentos endocíticos. Outros fatores de *H. pylori* rompem a barreira epitelial e facilitam a passagem de VacA. Dentro da lâmina própria, VacA interfere na ativação e proliferação dos linfócitos T. Vários desses efeitos de VacA são atribuídos à formação de canais de membrana. Traduzido de Cover e Blanke (2005).

1.3 Colonização por *Helicobacter pylori* e Resposta Imune do Hospedeiro

Para a colonização da mucosa gástrica, é necessário que *H. pylori* atravesse a camada de muco que protege o epitélio gástrico. Assim, lipases e proteases são sintetizadas para a degradação dessa camada, facilitando esta etapa de colonização. Além disto, *H. pylori* move-se facilmente devido à sua morfologia em espiral e aos seus flagelos, atravessando a camada de muco e estabelecendo íntimo contato com as células epiteliais de revestimento (LADEIRA et al., 2003). Os fatores de aderência contribuem para a sua fixação ao epitélio

gástrico, por meio da adesão à moléculas expressas na superfície dessas células, como os antígenos de grupos sanguíneos Lewis b (BOREN et al. 1993; HILL e RODE, 1998). Após essa adesão, a célula epitelial passa a ter contato com uma série de fatores de virulência da bactéria, como o SST4, CagA, VacA, dentre outros produtos bacterianos (O'KEEFFE e MORAN, 2008).

A resposta imune inata do hospedeiro se inicia através do reconhecimento de peptidoglicano, lipopolissacarídeo (LPS) e flagelina de *H. pylori*, pelos receptores toll-like (TLR) 2, 4 e 5, respectivamente (Figura 11) (ADEREM et al., 2000). Entretanto, estudos mostram que tanto o LPS quanto as flagelinas (FlaA e FlaB) dessa bactéria induzem uma ativação mínima de respostas mediadas pelos TLR4 e TLR5 (LEE et al., 2003; SCHMAUSSER et al., 2004).

Uma outra família de moléculas de reconhecimento de patógenos, a das proteínas Nod, parece ter um papel mais central na mediação da imunidade inata contra *H. pylori*. A proteína Nod-1, parte do sistema de reconhecimento intracelular, detecta peptídeos derivados do peptídeoglicano que compõe a parede celular da bactéria. Tal detecção estimula a sinalização através da ativação do fator de nuclear κ B (NF- κ B), que por sua vez leva à transcrição de vários genes, incluindo citocinas inflamatórias como a IL-8. O reconhecimento por Nod-1, provavelmente, é mais importante que por TLR, uma vez que a produção de NF- κ B e IL-8 nas células epiteliais se mostrou dependente dessa via de sinalização (VIALA et al., 2004).

Os componentes responsáveis pela ligação entre as respostas imunes inata e adaptativa à infecção por *H. pylori* são as células dendríticas (DC). Elas possuem um papel crítico, pois são as células que primariamente respondem aos produtos bacterianos, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos. O rompimento da barreira epitelial pela bactéria facilita a interação entre as DCs e *H. pylori* e seus antígenos. Após a ativação dos TLRs, as DCs ativam as células T de diferentes formas, induzindo também a resposta Th1 ou Th2/Treg pela geração de IL-12 ou IL-10, respectivamente (PEEK et al., 2010).

Dessa forma, a resposta imune adaptativa contra *H. pylori* acontece principalmente através das células T. Acredita-se que a inflamação da mucosa induzida pela bactéria seja causada pela polarização da resposta para o padrão Th1, embora em alguns casos também possa haver resposta Th2 (BAMFORD et al., 1998).

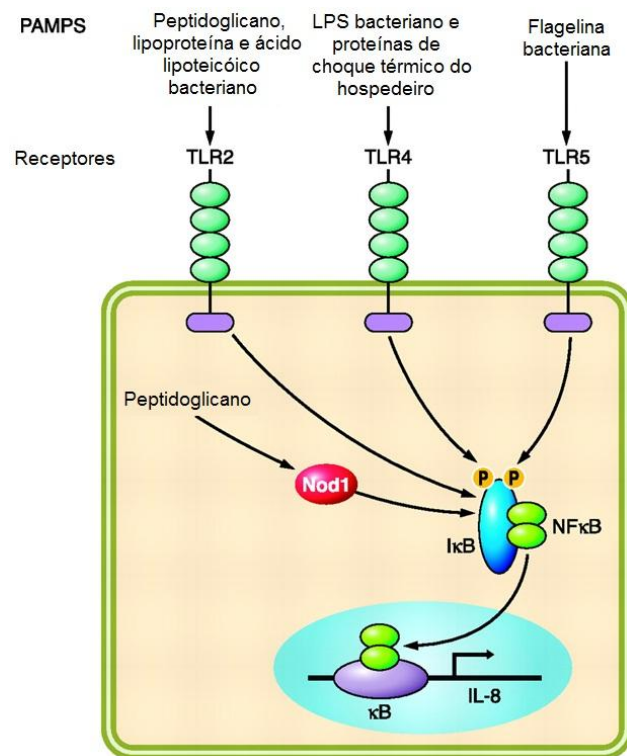


Figura 11 - Receptores Toll-like (TLRs) e o reconhecimento de patógenos. A ativação dos TLRs e receptores intracelulares (Nod-1) por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) desencadeia várias vias de sinalização intracelular que culminam na ativação de NF- κ B e subsequente produção de efetores inflamatórios e imunes, como a IL-8. Traduzido de Peek et al. (2010).

A polarização em direção a um perfil de citocinas Th1 pode contribuir para o desenvolvimento de úlcera péptica e doenças mais graves, enquanto a ativação de respostas do tipo Th2 resultam em uma melhora dos sintomas dispépticos (D'ELIOS et al., 2003). Estudos com modelos animais demonstraram que patologias induzidas por *H. pylori* são dependentes das respostas mediadas por células e citocinas do perfil de resposta Th1 (SOMMER et al., 2001; HELLMIG et al., 2003; STOICOV et al., 2004). Dessa forma, a resposta Th1 sem controle estaria relacionada à promoção de uma infecção crônica e ao desenvolvimento de doenças mais graves, embora seja este tipo de resposta aquele que confere uma real proteção contra a infecção (O'KEEFFE e MORAN, 2008).

1.4 Polimorfismos de Interleucinas

Algumas das citocinas envolvidas na resposta inflamatória possuem genes polimórficos. Tais polimorfismos alteram a expressão desses genes e, conseqüentemente, a intensidade da resposta inflamatória por parte do hospedeiro (KROEGER et al., 1997; LIAO et al., 2008).

1.4.1 Interleucina 1 Beta (IL1 β)

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzida na resposta do hospedeiro a uma variedade de estímulos endógenos e exógenos. Dentre seus efeitos biológicos destaca-se a capacidade de induzir a expressão de vários genes, como: *TNF*, *IL2*, *IL6*, *IL12*, moléculas de adesão, dentre outros. (EL-OMAR, 2001). Na mucosa gástrica, a IL-1 β age como um potente inibidor a secreção de ácido gástrico, possuindo também um papel principal no início e na amplificação da resposta inflamatória à infecção por *H. pylori* (BASSO et al., 2010).

A família de proteína IL-1 é um *cluster* responsável por codificar três genes: *IL1 α* , *IL1 β* e *IL1RN*. O gene humano de IL-1 β está localizado no cromossomo 2q, sendo produzido como um peptídeo precursor e ativado por processamento proteolítico (EL-OMAR et al., 2000). Dois polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) são identificados na região promotora deste gene nas posições: -511 e -31 (PEREZ-PEREZ et al., 2005). Desses SNPs, um dos mais estudados é o -511 C/T (rs 16944), no qual o alelo T está relacionado ao aumento dos níveis dessa interleucina na mucosa gástrica (FURUTA et al., 2002).

Diversos estudos mostram uma associação entre a presença do alelo polimórfico de *IL1 β* -511T ao risco do desenvolvimento de câncer gástrico (KUMAR et al., 2009; HE et al., 2011). Esse aumento de risco parece ser devido à supressão da secreção gástrica e intensa resposta inflamatória, que em conjunto levam à progressão das lesões gástricas (FURUTA et al., 2002).

1.4.2 Receptor Antagonista de Interleucina 1 (IL-1RN)

IL-1RN é uma citocina anti-inflamatória que se liga competitivamente ao receptor de IL-1 sem a ativação das células-alvo, agindo assim como um antagonista de IL-1 α e IL-1 β . Dessa forma, IL-1RN atua na modulação dos potenciais efeitos danosos de IL-1 α e IL-1 β (AL-MOUNDHRI et al., 2006). As concentrações plasmáticas de IL-1RN em doenças

inflamatórias e infecciosas são fortemente aumentadas, sendo aproximadamente 100 vezes maiores que as de IL-1 β . Acredita-se que a taxa IL-1 β /IL-1RN seja crítica para determinar a gravidade da reação inflamatória (SANTILLA et al., 1998).

Um polimorfismo de repetição é encontrado no intron 2 do gene de IL-1RN, no qual existe uma variação no número de uma sequência de 86 pb. Tal variação resulta em um alelo curto (*IL1RN*2*, duas repetições) e alelos longos (três a seis repetições), sendo o alelo curto aquele associado a uma maior produção de IL-1 β (SANTILLA et al., 1998). Devido a essa capacidade de influenciar os níveis de IL-1 β , o alelo curto de *IL1RN* tem sido muito estudado em relação com doenças gástricas, sendo encontrada em alguns um aumento do risco para essas doenças (EL-OMAR et al., 2001; MACHADO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2002).

1.4.3 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF)

TNF é uma poderosa citocina pró-inflamatória que, embora seja produzida por diversos tipos celulares, tem como principal fonte os macrófagos (VASSALLI, 1992). É produzida como uma molécula ligada à membrana de 26 kDa, a partir da qual é liberada na forma de uma molécula ativa solúvel de 17 kDa, através de clivagem enzimática (HAJEER e HUTCHINSON, 2000).

As funções biológicas de TNF são complexas e relacionadas à sua concentração e duração de exposição. Em situações agudas, a produção local desta citocina é claramente benéfica, pois leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, permitindo a passagem de células imunes, como neutrófilos e macrófagos, para os sítios com dano tecidual e infecção (BARBARA et al., 1996). Além disso, TNF ativa fagócitos para engolfar e eliminar agentes infecciosos e restos celulares. No entanto, exposições sistêmicas ou prolongadas ao TNF podem ser prejudiciais, uma vez que altos níveis dessa citocina na circulação estão associados ao choque tóxico (TRACEY et al., 1986). A indução de TNF para a produção de IL-1 e IL-6 leva ao aumento da temperatura, a sonolência e à liberação de glicocorticóides (HERMANN et al., 1998).

Na mucosa gástrica, essa citocina está envolvida na resposta à infecção por *H. pylori* e, assim como a IL-1 β , possui um efeito inibitório na produção de ácido clorídrico, embora mais fraco (BEALES et al., 1998). Reporta-se que essa citocina tenha várias vias de inibição da secreção gástrica, que ocorre em um nível pós-receptor e envolve vias dependentes e independentes de tirosina-quinase (SUGIMOTO et al., 2010).

O gene humano de *TNF* (ID: 7124) está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) e vários SNPs são relatados na região promotora deste gene nas posições -1031, -863, -857, -376, -308, -238, dentre outros (HAJEER e HUTCHINSON, 2000). Desses SNPs um dos mais extensivamente estudados é o polimorfismo -308 G/A (rs1800629), no qual o alelo polimórfico -308A está relacionado a uma maior atividade transcricional, quando comparado ao alelo selvagem -308G (KROEGER et al., 1997). Dessa forma, em pessoas portadoras do alelo polimórfico ocorre uma amplificação da cascata inflamatória contra a infecção e tal resposta inflamatória excessiva na mucosa gástrica pode estar associada tanto com a inibição da secreção gástrica, quanto a maior suscetibilidade ao câncer (FURUTA et al., 2002).

Devido ao fato da inflamação ser um importante componente de uma série de doenças, estudos têm demonstrado uma associação entre o alelo polimórfico de *TNF* -308A e o risco a essas doenças. Podem ser citadas como exemplo a doença celíaca (MCMANUS et al., 1996), a doença de Crohn (LOUIS et al., 1996), a colangite esclerosante hepática (BERNAL et al., 1999), doenças gástricas inflamatórias (gastrite e úlcera), bem como câncer de estômago (HOU et al., 2007).

1.4.4 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 foi originalmente identificada como um fator de diferenciação de células B, mas atualmente se sabe que esta é uma citocina multifuncional, que regula a resposta imune, hematopoiese e a resposta inflamatória de fase aguda (ISHIHARA e HIRANO, 2002). Ela é produzida tanto por células da imunidade (monócitos, linfócitos e macrófagos), quanto por outras células, como célula endotelial, célula epitelial intestinal e osteoclastos (LAUTA, 2001). Essa citocina atua como mensageiro entre as imunidades inata e adaptativa, estimulando a produção de interferon- γ (IFN- γ) pelas células T, promovendo a secreção de imunoglobulina por células B ativadas e ativação de células PMN (CURFS et al., 1997).

O gene humano da *IL6* (ID: 3569) está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p21) e possui quatro SNPs em sua região promotora (-597, -572, -373 e -174). Desses polimorfismos relatados, somente um parece afetar a transcrição do gene, o -174 G/C (rs1800795), sendo também assim o mais estudado (LIAO et al., 2008). O alelo selvagem -174G está relacionado a um maior nível de produção dessa interleucina que o alelo polimórfico -174C (FISHMAN et al., 1998).

Na mucosa gástrica, há uma estreita relação entre a infecção por *H. pylori* e a IL-6, uma vez que os níveis de mRNA dessa citocina têm sido correlacionados aos níveis de inflamação. Além disso, estudos mostraram que os níveis plasmáticos de IL-6 se encontravam elevados em gastrites associadas a *H. pylori*, além de estarem também relacionados a um prognóstico ruim em casos avançados de câncer gástrico (DE VITA et al., 2001). Quanto ao polimorfismo -174 G/C, o alelo -174G tem se mostrado associado a doenças inflamatórias como artrite crônica juvenil (FISHMAN et al., 1998), aterosclerose (BENNERMO et al., 2004), doenças cardiovasculares (HUMPHRIES et al., 2001), doenças gastroduodenais (KANG et al., 2009), cânceres (DEMICHELE et al., 2003; COZEN et al., 2004), dentre outras.

1.5 Polimorfismos de Interleucinas no Câncer Gástrico

Alguns estudos têm analisado a associação dos polimorfismos das citocinas ao risco do desenvolvimento de câncer gástrico, embora os resultados sejam controversos. Quanto aos polimorfismos de *IL1 β* -511 C/T e *IL1RN*, alguns estudos mostram uma associação entre o genótipo -511 TT e o alelo *IL1RN**2 e o desenvolvimento de câncer gástrico (AL-MOUNDHRI et al., 2009; KUMAR et al., 2009; MELO BARBOSA et al., 2009; HE et al., 2011), embora esses resultados variem de acordo com a população estudada.

Quanto ao polimorfismo de *TNF*, alguns desses estudos encontraram associação entre o alelo -308A e o aumento do risco (LU et al., 2005; HOU et al., 2007), embora outros não tenham identificado qualquer associação (KAMANGAR et al., 2006; CRUSIUS et al., 2008; MELO BARBOSA et al., 2009).

Já em relação ao polimorfismo de *IL6* -174 G/C, os estudos em câncer gástrico mostram que há uma associação entre o alelo -174G e o aumento no risco para desenvolvimento dessa neoplasia (GATTI et al., 2007), embora outros tenham mostrado resultados discordantes (EL-OMAR et al., 2003; SAVAGE et al., 2004).

1.6 Inflamação e Metilação de Promotores no Câncer Gástrico

O processo inflamatório exacerbado parece estar envolvido na carcinogênese gástrica, uma vez que esta pode ser responsável por: danos ao DNA, causados por estresse oxidativo; ativação da transcrição de fatores de crescimento, de genes anti-apoptótico e de moléculas de adesão, através da ativação de NF- κ B, e alguns outros fatores (LI e VERMA, 2002; FUENTES-PANANÁ et al., 2009). Alguns estudos também apontam a associação entre inflamação e metilação de regiões promotoras de determinados genes (CHAN et al., 2007; YOO et al., 2008).

A metilação ocorre em regiões do genoma ricas em citosina e guanina, denominadas de ilhas CpG. Alguns genes possuem ilhas CpG associadas que ficam localizadas quase sempre na região promotora do gene. A metilação das ilhas CpG constitui uma das principais vias epigenéticas envolvidas na regulação da transcrição gênica, que, por sua vez, está envolvida em processos de diferenciação celular, inativação do cromossomo X e *imprinting* gênico (JONES e LAIRD, 1999; ROBERTSON, 2005). Alterações no padrão de metilação dessas regiões promotoras podem resultar na inativação de genes supressores de tumor (HERMAN e BAYLIN, 2003; JONES e BAYLIN, 2002).

Alguns estudos demonstraram um aumento na metilação de ilhas CpG de vários genes na mucosa de pacientes infectados por *H. pylori* (MAEKITA et al., 2006; CHO et al., 2007). Dentre esses estão os genes *CDKN2A*, *MLH1* e *COX-2*. O gene *CDKN2A* é considerado um supressor tumoral, que codifica a proteína reguladora do ciclo celular p16^{INK4A}, envolvida na inibição da progressão da fase G1 (KSIAA et al., 2009). Já *MLH1* codifica uma enzima de reparo, cuja função é manter a fidelidade do genoma durante a proliferação celular (NAN et al., 2005). O gene *COX-2*, por sua vez, codifica uma proteína responsável tanto pela proliferação celular, quanto pela produção de prostaglandinas durante a inflamação gástrica (JACKSON et al., 2000; PAI et al., 2002).

Estudos confirmam ainda a existência de uma associação entre polimorfismos de interleucinas e a metilação de promotores gênicos no câncer gástrico. Tais estudos demonstraram que pacientes portadores do genótipo polimórfico de -511 C/T de *IL1 β* , que tem como consequência uma inflamação de maior intensidade, estavam predispostos ao desenvolvimento de câncer gástrico através da hipermetilação de ilhas CpG (GATTI et al., 2005; CHAN et al., 2007).

Tendo em vista que, embora vários estudos tenham sido feitos no intuito de avaliar a influência de *H. pylori* e dos polimorfismos de interleucinas na metilação de promotores gênicos no câncer gástrico, não se tem conhecimento de estudos que analisem os polimorfismos associados aos genes de virulência de *H. pylori*. Além disso, todos os trabalhos acerca dos polimorfismos de interleucinas no desenvolvimento dessa neoplasia constituem estudos de risco, deixando de correlacionar tais polimorfismos a presença de fatores de virulência de *H. pylori*.

1.7 Perguntas de Partida

- A virulência de *H. pylori* e o genótipo do hospedeiro (em relação aos polimorfismos de interleucinas) associados levariam a uma maior taxa de metilação de regiões promotoras de genes envolvidos na carcinogênese gástrica?
- Existe uma relação entre a presença de genes de virulência de *H. pylori* e polimorfismos de interleucinas que resultariam no desenvolvimento de câncer? Qual seria essa relação?

1.8 Hipóteses de Trabalho

- Pacientes portadores de determinados polimorfismos de interleucinas (*IL1 β* , *IL1RN*, *IL6*, *TNF*) e infectados por cepas mais virulentas possuem uma maior taxa de metilação de promotores de genes envolvidos na carcinogênese gástrica;
- Existe uma relação entre a patogenicidade da cepa de *H. pylori* e a intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro, na qual cepas mais virulentas associadas a uma resposta inflamatória mais intensa favoreceriam o desenvolvimento do câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Relacionar o perfil genotípico de virulência de *Helicobacter pylori* com o perfil genotípico dos polimorfismos de interleucinas pró-inflamatórias em pacientes com adenocarcinoma gástrico, bem como os correlacionar com a metilação de promotores gênicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Genotipar cepas de *H. pylori* quanto aos genes de virulência *vacA*, *cagA*, *cagE* e *virB11* presentes em pacientes com câncer gástrico;
- Detectar a frequência dos polimorfismos -511 C/T de *IL1 β* , *IL1RN*, -308 G/A de *TNF* e -174 G/C de *IL6*, nestes pacientes;
- Detectar a metilação dos promotores dos genes *CDKN2A*, *MLH1* e *COX-2* nas amostras tumorais;
- Correlacionar características clínico-epidemiológicas com a distribuição genotípica dos polimorfismos estudados e com os genótipos de *H. pylori*;
- Correlacionar as cepas de *H. pylori* com a presença dos polimorfismos na amostra estudada;
- Correlacionar a metilação dos promotores gênicos estudados com o genótipo de *H. pylori* e com a presença dos polimorfismos de interleucinas.

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. **Toll-like receptors in the induction of the innate immune response.** *Nature.* v. 406, p. 782–787, 2000.
- AL-MOUNDHRI, M. S.; AL-NABHANI, M.; AL-BAHRANI, B.; BURNEY, I. A.; AL-MADHANI, A.; GANGULY, S. S.; AL-YAHYAEE, S. A.; GRANT, C. S. **Interleukin-1b gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL1RN) polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population.** *Gastric Cancer.* v. 9, p. 284–290, 2006.
- ANDO, T.; GOTO, Y.; MAEDA, O.; WATANABE, O.; ISHIGURO, K.; GOTO, H. **Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer.** *World J. Gastroenterol.* v. 12, p. 181–186, 2006.
- ATHERTON, J. C. **The Pathogenesis of *Helicobacter pylori*–Induced Gastro-Duodenal Diseases.** *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* v. 1, p. 63–96, 2006.
- 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.
- BARBARA, J. A.; VAN OSTADE, X.; LOPEZ, A. **Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective.** *Immunol. Cell. Biol.* v. 74, p. 434–443, 1996.
- BARBER, M.; FITZGERALD, R. C.; CALDAS, C. **Familial gastric cancer – aetiology and pathogenesis.** *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* v. 20, p. 721–734, 2006.
- BASSO, D.; PLEBANI, M.; KUSTERS, J. G. **Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection.** *Helicobacter.* v. 15, p. 14–20, 2010.
- BEALES, I. L.; CALAM, J. **Interleukin 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.
- BENNERMO, M.; HELD, C.; STEMME, S.; ERICSSON, C. G.; SILVEIRA, A.; GREEN, F.; TORNVALL, P. **Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases?** *Clin. Chem.* v. 50, p. 2136–2140, 2004.
- BERNAL, W.; MOLONEY, M.; UNDERHILL, J.; DONALDSON, P. T. **Association of tumor necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis.** *J Hepatol.* v. 30, p. 237–41, 1999.
- BLASER, M. J.; ATHERTON, J. C. ***Helicobacter pylori* persistence: biology and disease.** *J Clin. Invest.* v. 113, p. 321–333, 2004.
- BOREN, T.; FALK, P.; ROTH, K. A.; LARSON, G.; NORMARK, S. **Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood-group antigens.** *Science.* v. 262, p. 1892–1895, 1993.

CARNEIRO, F.; HUNTSMAN, D. G.; SMYRK, T. C.; OWEN, D. A.; SERUCA, R.; PHAROAH, P.; CALDAS, C.; SOBRINHO-SIMÕES, M. **Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening.** *J Pathol.* v. 203, p. 681-7, 2004.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J. E.; GHIARA, P.; BORODOVSKY, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. **CagA pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors.** *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 93, p. 14648–14653, 1996.

CHAN, A. O.; CHU, K. M.; HUANG, C.; LAM, K. F.; LEUNG, S. Y.; SUN, Y. W.; KO, S.; XIA, H. H.; CHO, C. H.; HUI, W. M.; LAM, S. K.; RASHID, A. **Association between *Helicobacter pylori* infection and interleukin 1 beta polymorphism predispose to CpG island methylation in gastric cancer.** *Gut.* v. 56, p. 595–597, 2007.

CHO, N. Y.; KIM, B. H.; CHOI, M.; YOO, E. J.; MOON, K. C.; CHO, Y. M.; KIM, D.; KANG, G. H. **Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features.** *J. Pathol.* v. 211, p. 269–277, 2007.

CORREA, P. **Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process.** *Cancer Res.* v. 52, p. 6735–6740, 1992.

CORREIA, M.; MACHADO, J. C.; RISTIMÄKI, A. **Basic aspects of gastric cancer.** *Helicobacter.* v. 14, p. 36-40, 2009.

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

COZEN, W.; GILL, P. S.; INGLES, S. A.; et al. **IL6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma.** *Blood.* v. 103, p. 3216–3221, 2004.

CRUSIUS, J. B. A.; CANZIAN, F.; CAPELLA, G.; PEÑA, A. S.; PERA, G.; SALA, N.; AGUDO, A.; RICO, F.; DEL GIUDICE, G.; PALLI, D.; PLEBANI, M.; BOEING, H.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; CARNEIRO, F.; PALA, 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.; TJØNNELAND, 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. **Cytokine gene polymorphisms and the risk of adenocarcinoma of the stomach in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST).** *Ann. Oncology.* v. 19, p. 1894–1902, 2008.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. **A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers.** *Clin. Microbiol. Rev.* v. 10, p. 742–780, 1997.

D'ELIOS, M. M.; AMEDEI, A.; DEL PRETE, G. ***Helicobacter pylori* antigen-specific T-cell responses at gastric level in chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer and low-**

grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Microbes Infect.* v. 5, p. 723–730, 2003.

DEMICHELE, A.; MARTIN, A. M.; MICK, R.; GOR, P.; WRAY, L.; KLEIN-CABRAL, M.; ATHANASIADIS, G.; COLLIGAN, T.; STADTMAUER, E.; WEBER, B. **Interleukin-6 -174G->C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer.** *Cancer Res.* v. 63, p. 8051–8056, 2003.

DE VITA, F.; ROMANO, C.; ORDITURA, M.; GALIZIA, G.; MARTINELLI, E.; LIETO, E.; CATALANO, G. **Interleukin-6 serum level correlates with survival in advanced gastrointestinal cancer patients but is not an independent prognostic indicator.** *J. Interferon Cytokine Res.* v. 21, p. 45–52, 2001.

DOURAGHI, M.; TALEBKHAN, Y.; ZERAATI, H.; EBRAHIMZADEH, F.; NAHVIJOO, A.; MORAKABATI, A.; GHAFARPOUR, M.; ESMAILI, M.; BABABEIK, M.; OGHALAIE, A.; RAKHSHANI, N.; HOSSEINI, M. E.; MOHAGHEGHI, M. A.; MOHAMMADI, M. **Multiple gene status in *Helicobacter pylori* strains and risk of gastric cancer development.** *Digestion.* v. 80, p. 200–207, 2009.

EL-OMAR, E. M.; CARRINGTON, M.; CHOW, W. H.; MCCOLL, K. E.; BREAM, J. H.; YOUNG, H. A.; HERRERA, J.; LISSOWSKA, J.; YUAN, C. C.; ROTHMAN, N.; LANYON, G.; MARTIN, M.; FRAUMENI, J. F. JR.; RABKIN, C. S. **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 1h 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, J. F. JR.; CHOW, W. H. **Increased Risk of Noncardia Gastric Cancer Associated With Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms.** *Gastroenterology.* v. 124, p. 1193–1201, 2003.

ENROTH, H.; KRAAZ, W.; ENGSTRAND, L.; NYREN, O.; ROHAN, T. ***Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study.** *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* v. 9, p. 981–985, 2000.

ESPEJO, E.; NAVARRETE, S. J. **Classification of stomach adenocarcinomas.** *Rev. Gastroenterol.* v. 23, p. 199-212, 2003.

FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS CD, PARKIN D. GLOBOCAN 2008, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide.** IARC Cancer Base No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; Year. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 24 ago. 2011.

FIGUEIREDO, C.; MACHADO, J. C.; PHAROAH, P.; SERUCA, R.; SOUSA, S.; CARVALHO, R.; CAPELINHA, A. F.; QUINT, W.; CALDAS, C.; VAN DOORN, L. J.; CARNEIRO, F.; SOBRINHO-SIMÕES, M. ***Helicobacter pylori* and interleukin 1**

genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. J Natl Cancer Inst. v. 94, p. 1680–7, 2002.

FISCHER, W.; PULS, J.; BUHRDORF, R.; GEBERT, B.; ODENBREIT, S.; HAAS, R. **Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8.** Mol. Microbiol. v. 42, p. 1337–1348, 2001.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. **The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL6) gene on IL6 transcription and plasma IL6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis.** J. Clin. Invest. v. 102, p. 1369–1376, 1998.

FRANCO, A. T.; ISRAEL, D. A.; WASHINGTON, M. K.; KRISHNA, U.; FOX, J. G.; ROGERS, A. B.; NEISH, A. S.; COLLIER-HYAMS, L.; PEREZ-PEREZ, G. I.; HATAKEYAMA, M.; WHITEHEAD, R.; GAUS, K.; O'BRIEN, D. P.; ROMERO-GALLO, J.; PEEK, R. M. Jr. **Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*.** Proc Natl Acad Sci USA. v. 102, p. 10646–10651, 2005.

FRANCO, A.T.; JOHNSTON, E.; KRISHNA, U.; YAMAOKA, Y.; ISRAEL, D. A.; NAGY, T. A.; WROBLEWSKI, L. E.; PIAZUELO, M. B.; CORREA, P.; PEEK, R. M. Jr. **Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors.** Cancer Res. v. 68, p. 379–387, 2008.

FRANKE, A.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. **Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach.** Dig. Dis. v. 23, p. 204–213, 2005.

FRONZES, R.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G. **The structural biology of type IV secretion systems.** Nat. Rev. Microbiol. v. 7, p. 703–714, 2009.

FUENTES-PANANÁ, E.; CAMORLINGA-PONCE, M.; MALDONADO-BERNAL, C. **Infección, inflamación y cáncer gástrico.** Salud Publica Mex. v. 51, p. 427–433, 2009.

FURUTA, T.; EL-OMAR, E. M.; XIAO, F.; SHIRAI, N.; TAKASHIMA, M.; SUGIMURA, H. **Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan.** Gastroenterology. v. 123, p. 92–105, 2002.

GATTI, L. L.; ZAMBALDI-TUNES, M.; DE LÁBIO, R. W.; SILVA, L. C.; CARDOSO-SMITH, M. A.; MARQUES-PAYÃO, S. L. **Interleukin-6 polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in Brazilian adult patients with chronic gastritis.** Clin. Exp. Med. v. 5, p. 112–116, 2005.

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.** Arch. Med. Res. v. 38, p. 551–555, 2007.

GLADE, M. J. **Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective.** American Institute for Cancer Research/ World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition. v. 15, p. 523–526, 1999.

GO, M. F. **Treatment and management of *Helicobacter pylori* infection.** Curr Gastroenterol. Rep. v. 4, p. 471–477, 2002.

GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T.; PETERS, M.; COLLINS, M. D.; SLY, L.; McCONNELL, W.; HARPER, W. **Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively.** Internat. J. Syst. Bacteriol. v. 39, p. 397–405, 1989.

GRAZIANO, F.; HUMAR, B.; GUILFORD, P. **The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice.** Ann. Oncol. v. 14, p. 1705–1713, 2003.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. **TNF- α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications.** Microsc. Res. Tech. v. 50, p. 216–228, 2000.

HAMILTON, S. R.; AALTONEN, L. A. (Eds.): **World Health Organization Classification of Tumours.** Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Press: Lyon 2000.

HARTGRINK, H. H.; JANSEN, E. P. M.; VAN GRIEKEN, N. C. T.; VAN DE VELDE, C. J. H. **Gastric cancer.** Lancet. v. 374, p. 477–490, 2009.

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 1 Receptor Antagonist (IL1RN) Genes Associate with Gastric Cancer Risk in the Chinese Population.** Dig Dis Sci. v. 56, p. 2017–2023, 2011.

HELLMIG, S.; HAMPE, J.; SCHREIBER, S. ***Helicobacter pylori* infection in Africa and Europe: enigma of host genetics.** Gut. v. 52, p. 1799, 2003.

HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. **Mechanisms of disease: gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.** N. Engl. J. Med. v. 349, p. 2042–2054, 2003.

HERMANN, D. M.; MULLINGTON, J.; HINZE-SELCH, D.; SCHREIBER, W.; GALANOS, C.; POLLMACHER, T. **Endotoxin-induced changes in sleep and sleepiness during the day.** Psychoneuroendocrinology. v. 23, p. 427–437, 1998.

HILL P, RODE J. ***Helicobacter pylori* in ectopic gastric mucosa in Meckel's diverticulum.** Pathology. v. 30, p. 7–9, 1998.

HOU, L.; EL-OMAR, E. M.; CHEN, J.; GRILLO, P.; RABKIN, C. S.; BACCARELLI, A.; YEAGER, M.; CHANOCK, S. J.; ZATONSKI, W.; SOBIN, L. H.; LISSOWSKA, J.; FRAUMENI, J. F. JR; CHOW, W. H. **Polymorphisms in Th1-type cell-mediated response genes and risk of gastric cancer.** Carcinogenesis v. 28, p. 118–123, 2007.

HUANG, J. Q.; ZHENG, G. F.; SUMANAC, K.; IRVINE, E. J.; HUNT, R. H. **Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer.** *Gastroenterology*. v. 125, p. 1636–1644, 2003.

HUMPHRIES, S. E.; LUONG, L. A.; OGG, M. S.; HAWE, E.; MILLER, G. J. **The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men.** *Eur. Heart. J.* v. 22, p. 2243–2252, 2001.

HUNTSMAN, D. G.; CARNEIRO, F.; LEWIS, F. R.; MACLEOD, P. M.; HAYASHI, A.; MONAGHAN, K. G.; MAUNG, R.; SERUCA, R.; JACKSON, C. E.; CALDAS, C. **Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations.** *N. Engl. J. Med.* v. 344, p. 1904–1909, 2001.

IARC: HAMILTON S.R., AALTONEN L.A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.** Press: Lyon 2000.

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

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. 8, p. 181–186, 2001.

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

ISHIHARA, K.; HIRANO, T. **IL6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease.** *Cytokine & Growth Factor Rev.* v. 13, p. 357–368, 2002.

JACKSON, L. M.; WU, K. C.; MAHIDA, Y. R.; JENKINS, D.; HAWKEY, C. J. **Cyclooxygenase 1 and 2 in normal, inflamed and ulcerated human gastric mucosa.** *Gut.* v. 47, p. 762–770, 2000.

JONES, P. A.; LAIRD, P. W. **Cancer epigenetics comes of age.** *Nature Genet.* v. 21, p. 163–167, 1999.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** *Nat. Rev. Genet.* v. 3, p. 415–428, 2002.

KAMANGAR, F.; ABNET, C. C.; HUTCHINSON, A. A.; NEWSCHAFER, 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 and 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, I. S. **The Effects of Genetic Polymorphisms of IL6, IL-8, and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced Gastrointestinal Diseases in Korea.** *J. Clin. Gastroenterol.* v. 43, p. 420–428, 2009.

KHALIFA, M.; SHARAF, R.; AZIZ, R. **Helicobacter pylori: a poor man's gut pathogen?** Gut. Pathogens. v. 2, p. 1–12, 2010.

KOKKOLA, A.; SIPPONEN, P. **Gastric carcinoma in young adults.** Hepatogastroenterology. v. 48, p. 1552–1555, 2001.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T. **Gastric Cancer and Helicobacter pylori Infection.** J. Physiol. and Pharmacol. v. 57, p. 51–65, 2006.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. **The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription.** Mol. Immunol. v. 34, p. 391–399, 1997.

KSIAA, F.; ZIADI, S.; AMARA, K.; KORBI, S.; TRIMECHE, M. **Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma.** Clin. Chim. Acta. v. 404, p. 128–133, 2009.

KUMAR, S.; KUMAR, A.; DIXIT, V. K. **Evidences showing association of interleukin-1B polymorphisms with increased risk of gastric cancer in an Indian population.** Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 387, p. 456–460, 2009.

KUTTER, S.; BUHRDORF, R.; HAAS, J.; SCHNEIDER-BRACHERT, W.; HAAS, R.; FISCHER, W. **Protein subassemblies of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion system revealed by localization and interaction studies.** J. Bacteriol. v. 190, p. 2161–2171, 2008.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADOR, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. **Biopatologia do Helicobacter pylori.** J. Bras. Patol. Med. Lab. v. 39, p. 335–342, 2003.

LADEIRAS-LOPES, R.; PEREIRA, A. K.; NOGUEIRA, A.; PINHEIRO-TORRES, T.; PINTO, I.; SANTOS-PEREIRA, R.; LUNET, N. **Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies.** Cancer Causes Control. v. 19, p. 689–701, 2008.

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.

LAUTA, V. M. **Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data.** Cytokine. v. 16, p. 79–86, 2001.

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.

LETLEY, D. P.; RHEAD, J. L.; TWELLS, R. J.; DOVE, B.; ATHERTON, J. C. **Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen Helicobacter pylori.** J. Biol. Chem. v. 278, p. 26734–26741, 2003.

LI, Q.; VERMA, I. M. **NF-kappa B regulation in the immune system.** Nat. Rev. Immunol. v. 2, p. 725–734, 2002.

LIAO, W. C.; LIN, J. T.; WU, C. Y.; HUANG, S. P.; LIN, M. T.; WU, A. S. H.; 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. 428–434, 2008.

LIM, S.; LEE, H. S.; KIM, H. S.; KIM, Y. I.; KIM, W. H. **Alteration of E-cadherin-mediated adhesion protein is common, but microsatellite instability is uncommon in young age gastric cancers.** Histopathology. v. 42, p. 128–136, 2003.

LIMA, V. P.; SILVA-FERNANDES, I. J. L.; ALVES, M. K. S.; RABENHORST, S. H. B. **Prevalence of Helicobacter pylori genotypes (vacA, cagA, cagE and virB11) in gastric cancer in Brazilian's patients: An association with histopathological parameters.** Cancer Epidemiology, 2011.

LIU, C.; RUSSELL, R. M. **Nutrition and gastric cancer risk: an update.** Nutr. Rev. v. 66, p. 237–249, 2008.

LOGAN, R. P.; WALKER, M. M. **ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection.** BMJ. v. 323, p. 920–922, 2001.

LOUIS, E.; SATSANGI, J.; ROUSSOMOUSTAKAKI, M.; PARKES, M.; FANNING, G.; WELSH, K.; JEWELL, D. **Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease.** Gut. v. 39, p. 705–710, 1996.

LYNCH, H. T.; KAURAH, P.; WIRTZFELD, D.; RUBINSTEIN, W. S.; WEISSMAN, S.; LYNCH, J. F.; GRADY, W.; WIYRICK, S.; SENZ, J.; HUNTSMAN, D. G. **Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis, genetic counseling, and prophylactic total gastrectomy.** Cancer. v. 112, p. 2655–2663, 2008.

LU, W.; PAN, K.; ZHANG, L.; LIN, D.; MIAO, X.; YOU, W. **Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor alpha and risk of gastric cancer in a Chinese population.** Carcinogenesis. v. 26, p. 631–636, 2005.

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 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma.** Gastroenterology. v. 121, p. 823–9, 2001.

MAEKITA, T.; NAKAZAWA, K.; MIHARA, M.; NAKAJIMA, T.; YANAOKA, K.; IGUCHI, M.; ARII, K.; KANEDA, A.; TSUKAMOTO, T.; TATEMATSU, M.; TAMURA, G.; SAITO, D.; SUGIMURA, T.; ICHINOSE, M.; USHIJIMA, T. **High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk.** Clin. Cancer Res. v. 12, p. 989–995, 2006.

MCMANUS, R.; WILSON, A. G.; MANSFIELD, J.; WEIR, D. G.; DUFF, G. W.; KELLEHER, D. **TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis-alpha gene promoter, is**

a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. Eur. J. Immunol. v. 26, p. 2113–2118, 1996.

MELO BARBOSA, H. P.; MARTINS, L. C.; DOS SANTOS, S. E. B.; DEMACHKI, S.; ASSUMPCÃO, M. B.; ARAGÃO, C. B.; CORVELO, T. C. O. **Interleukin-1 and TNF polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population.** World J. Gastroenterol. v. 15, p. 1465–1471, 2009.

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

MURATA-KAMIYA, N. **Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*.** Microbes and Infection. v. 13, p. 799–807, 2011.

NAN, H. M.; SONG, Y. J.; YUN, H. Y.; PARK, J. S.; KIM, H. **Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer.** World J. Gastroenterol. v. 11, p. 3834–3841, 2005.

NCBI – National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 08 de setembre de 2011.

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.; JOSENHANS, C.; MOODLEY, Y.; UHR, M.; STAMER, C.; VAUTERIN, 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.

OWEN, R. J.; PETERS, T. M.; VAREA, R.; TEARE, E. L.; SAVERYMUTTU, S. **Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in England: prevalence of cag pathogenicity island markers and IS605 presence in relation to patient age and severity of gastric disease.** FEMS Immunol. Med. Microbiol. v. 30, p. 65–71, 2001.

PAGLIACCIA, C.; DE BERNARD, M.; LUPETTI, P.; JI, X.; BURRONI, D.; COVER, T. L.; PAPINI, E.; RAPPUOLI, R.; TELFORD, J. L.; REYRAT, J. M. **The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 95, p. 10212–10217, 1998.

PAI, R.; SOREGHAN, B.; SZABO, I. L.; PAVELKA, M.; BAATAR, D.; TARNAWSKI, A. S. **Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy.** Nat. Med. v. 8, p. 289–293, 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.

PEEK R. M. JR.; FISKE C.; WILSON, K. T. **Role of Innate Immunity in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Malignancy.** Physiol. Rev. v. 90, p. 831–858, 2010.

PEREZ-PEREZ, G. I. P.; GARZA-GONZALEZ, E.; PORTAL, C.; OLIVARES, A. Z. **Role of Cytokine Polymorphisms in the Risk of Distal Gastric Cancer Development.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v. 14, p. 1869-73, 2005.

ROBERTSON, K. D. **DNA methylation and human disease.** *Nat. Rev. Genet.* v. 6, p. 597–610, 2005.

SANTTILA, S.; SAVINAINEN, K.; HURME, M. **Presence of the *IL-1RA* allele 2 (*IL1RN*2*) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro.** *Scand J Immunol.* v. 47, p. 195–8, 1998.

SAVAGE, S. A.; ABNET, C. C.; HAQUE, K.; MARK, S. D.; QIAO, Y. L.; DONG, Z. W.; DAWSEY, S. M.; TAYLOR, P. R.; CHANOCK, S. J. **Polymorphisms in Interleukin -2, -6, and -10 Are Not Associated with Gastric Cardia or Esophageal Cancer in a High-Risk Chinese Population.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* v. 13, p. 1547–1549, 2004.

SCHMAUSSER, B.; ANDRULIS, M.; ENDRICH, S.; LEE, S. K.; JOSENHANS, C.; MÜLLER-HERMELINK, H. K.; ECK, M. **Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection.** *Clin. Exp. Immunol.* v. 136, p. 521–526, 2004.

SCHNEIDER, B. G.; CAMARGO, M. C.; RYCKMAN, K. K.; SICINSCHI, L. A.; PIAZUELO, M. B.; ZABALETA, J.; CORREA, P.; WILLIAMS, S. M. **Cytokine polymorphisms and gastric cancer risk: an evolving view.** *Cancer Biol. Ther.* v. 7, p. 157–162, 2008.

SHANKS, A. M.; EL-OMAR, E. M. ***Helicobacter pylori* infection, host genetics and gastric cancer.** *J. Dig. Dis.* v. 10, p. 157–164, 2009.

SOMMER F, FALLER G, ROLLINGHOFF M, KIRCHNER T, MAK TW, LOHOFF M. **Lack of gastritis and of an adaptive immune response in interferon regulatory factor-1-deficient mice infected with *Helicobacter pylori*.** *Eur. J. Immunol.* v. 31, p. 396–402, 2001.

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

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. 3329–3336, 2004.

SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. ***Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host.** *Nature.* v. 441–452, 2007.

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

SUNDRUD MS, TORRES VJ, UNUTMAZ D, COVER TL. **Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 101, p. 7727–7732, 2004.

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. v. 108, p. 929–937, 2001.

TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S.; MILSARK, I. W.; HARIRI, R. J.; FAHEY, T. J.; ZENTELLA, A.; ALBERT, J. D.; SHIRES, T. G.; CERAMI, A. **Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.** Science. v. 234, p. 470–474, 1986.

TUMMURU, M. K.; SHARMA, S. A.; BLASER, M. J. ***Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells.** Mol. Microbiol. v. 18, p. 867–876, 1995.

VAN DOORN, L. J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PLAISIER, A.; SCHNEEBERGER, P.; DE BOER, W.; QUINT, W. **Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*.** Gastroenterology. v. 115, p. 58–66, 1998.

VASSALLI, P. **The pathophysiology of tumor necrosis factors.** Annu. Rev. Immunol. v. 10, p. 411–452, 1992.

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.** Nat. Immun. v. 5, p. 1166–1174, 2004.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. **Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis.** Lancet, 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., HÖFLER, H. **Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology.** J. Cancer Res. Clin. Oncol. v. 127, p. 207–216, 2001.

WIKIPEDIA: Disponível em: <<http://www.wikipedia.com.br>>. Acesso em: 15 set. 2011.

WU, C.; LEE, Y.; WANG, T.; LEE, L.; KONG, W.; CHEN, E.; WEI, M.; LIANG, Y.; HWANG, T. **Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray.** Oncol. Rep. v. 15, p. 57–64, 2006.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; GUTIERREZ, O.; KIM, J. G.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D. Y. **Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries.** J Clin Microbiol. v. 37, p. 2274–2279, 1999.

YAMAOKA, Y.; KIKUCHI, S.; EL-ZIMAITY, H. M.; GUTIERREZ, O.; OSATO, M. S.; GRAHAM, D. Y. **Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production.** *Gastroenterology*. v. 123, p. 414–424, 2002.

YAMAOKA, Y. **Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease.** *J. Infect. Dev. Ctries*. v. 2, p. 174–181, 2008.

YANG, J. J.; KO, K. P.; CHO, L. Y.; SHIN, A.; GWACK, J.; CHANG, S. H.; SHIN, H. R.; YOO, K. Y.; KANG, D.; PARK, S. K. **The role of TNF genetic variants and the interaction with cigarette smoking for gastric cancer risk: a nested case-control study.** *BMC Cancer*. v. 238, p. 1–10, 2009.

YOO, E. J., PARK, S. Y., CHO, N. Y., KIM, N., LEE, H. S., KANG, G. H. ***Helicobacter pylori*-infection-associated CpG island hypermethylation in the stomach and its possible association with Polycomb repressive marks.** *Virchows Arch*. v. 452, p. 515–524, 2008.

3. ARTIGO I

Submetido à Molecular Carcinogenesis

Fator de Impacto: 3.265 – Qualis A2 (Ciências Biológicas III)

Em 25 de outubro de 2011

Proinflammatory Interleukin Polymorphisms and Differential Methylation Status In Gastric Cancer: An Association With *Helicobacter Pylori* Infection

Running title: Cytokine polymorphism and methylation status in gastric cancer

Débora Menezes da Costa¹, Eduardo Henrique Cunha Neves Filho¹, Markênia Kélia Santos
Alves¹, Silvia Helena Barem Rabenhorst^{1*}

¹Universidade Federal do Ceará
Department of Pathology and Forensic Medicine
Rua Cel. Nunes de Melo, 1315
Porangabussu - CEP 60183-630
Fortaleza, Brazil.

*Silvia Helena Barem Rabenhorst

Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina

Departamento de Patologia e Medicina Legal

Rua Cel. Nunes de Melo, 1315

Porangabussu CEP 60183-630

Fortaleza/CE, Brazil.

Tel.: +55 (85) 3366.8639

Fax: +55 (85) 3267.3840

e-mail: srabenhorst@ hotmail.com

Abstract

Background: Interleukin polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection are believed to play critical roles in the DNA methylation process, an epigenetic feature frequently associated with gastric carcinogenesis. The aim of this study was to determine the associations between the polymorphisms of interleukins and the methylation status of three gastric cancer-related genes. **Material and Methods:** The influence of *H. pylori* strains was also assessed. DNA extracted from 80 gastric tumor samples was available for interleukin polymorphism genotyping by PCR-RFLP, promoter methylation identification by MS-PCR and *H. pylori* detection and later the 75 positive *H. pylori* samples were subtyping (*cagA*, *cagE*, *virB11*, *vacA* and *flaA* genes) by PCR. **Results:** In the cardia tumors, methylation in promoter region of *COX-2* was associated with *IL1RN*2* ($p= 0.015$), and the associated genotypes *IL1B* 511T + *IL1RN*2* seem to be important in the methylation of *COX-2* ($p= 0.013$), especially in the presence of *cagA*+ ($p= 0.026$) and *vacA* *s1* ($p= 0.025$) *H. pylori* strains. The associated genotypes of *IL6* CC+*TNF* GG seem to be involved in the unmethylation of *CDKN2A* ($p= 0.046$) and *MLH1* ($p=0.031$), respectively, along with *H. pylori* *cagA*+ infection. **Conclusion:** DNA methylation in gastric cancer seems to be influenced by the presence of interleukin polymorphisms and by the *H. pylori* *cagA/vacAs1m1* strains.

Keywords: Gastric Cancer; *Helicobacter pylori* genotypes, methylation, interleukin polymorphisms

INTRODUCTION

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium that infects the human gastric mucosa and has been designated as a human class I carcinogen of gastric malignancies by the International Agency for Research on Cancer [1]. It is known that *H. pylori* infection triggers chronic inflammation of the stomach, which can lead to stepwise development of the malignancy [2,3].

Several proinflammatory interleukins, including interleukin 1 β (IL1B), interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN), IL6 and tumor necrosis factor (TNF) have been described as being upregulated in the presence of *H. pylori* infection [4,5]. Genes encoding interleukins harbor polymorphic regions, which usually are considered to alter gene transcription and thereby influence inflammatory processes in response to infectious diseases. In the *IL1B* gene, the T allele of -511 C/T polymorphism in the regulatory region has been found to be associated with increased production of this interleukin. The IL1RN is an anti-inflammatory interleukin that competitively binds to IL-1 receptors and thereby modulates the potentially damaging effects of IL-1 [6]. This gene has a variable number tandem repeat in intron 2, resulting in a short allele (IL1RN*2, two repeats) or long alleles (IL1RN*L, three to six repeats). Santtila et al. [7] demonstrated in a study in vitro that IL1RN*2 is associated with increased IL1 β production. In fact, the presence of these polymorphisms and also *TNF* and *IL6*, has been associated with an increased risk of *H. pylori*-induced hypochlorhydria [8] and gastric cancer [5;9-12], although the mechanisms in which these polymorphisms are associated with gastric carcinogenesis are not well understood.

DNA methylation is an important cellular mechanism modulating gene expression associated with aging and inflammation. Some studies have confirmed the association between *IL1B* polymorphisms and methylation of CpG islands in gastric cancer [12,13].

Additionally, some studies have demonstrated enhanced hypermethylation in multiple CpG island loci in gastric mucosa of *H. pylori*-infected patients [15,16], supporting the hypothesis that patients with *H. pylori* infection and *IL1B* -511 T/T genotype may be predisposed to gastric cancer through the CpG island methylation pathway. However, there are few studies in this field, and no one so far has related promoter methylation to interleukin polymorphisms other than those in *IL1B*. When the *H. pylori* genotype is taken into account, it is restricted to the presence of the *cagA* gene. This study is the first to examine the relationship between host and bacterial genotype regarding methylation pattern.

Among the methylated genes found in gastric cancer, two of them had already been described as usual; the *MLH1* and the *CDKN2A* genes. *MLH1* encodes a mismatch repair enzyme that maintains the fidelity of the genome during cell proliferation [17]. *CDKN2A* encodes a tumor suppressor gene, p16^{INK4A}, a cell cycle regulator involved in the inhibition of G1 phase progression, which are associated with the early stages of gastric carcinogenesis. Additionally, methylation of the *COX-2* gene has been associated with its underexpression in gastric cancer studies [18,19]. The *COX-2* gene encodes a protein responsible for cell proliferation by the activation of *EGFR* [20]; it inhibits apoptosis by upregulation of *bcl-2* [21]. COX-2 is a key enzyme responsible for prostaglandin production during gastric inflammation and ulcer healing [22]. The presence of COX-2 expression in gastric carcinogenesis is a controversial issue [19;23,24].

There is no information if the polymorphisms of proinflammatory interleukins could affect the methylation process. For filling the information lacking in this field, this study aimed to determine the associations between the *IL1B*, *IL1RN*, *TNF* and *IL6* polymorphisms and the DNA methylation status of three candidate genes (*MLH1*, *CDKN2A* and *COX-2*), largely associated with gastric carcinogenesis, and the influence of *H. pylori* strains in this process.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The present study was approved by the Hospital Ethics Committee of the Federal University of Ceará, Brazil, and all subjects signed an informed consent form before inclusion. A total of 125 tumor samples of *H. pylori*-positive patients who had undergone gastrectomy at University Hospital Walter Cantídeo, Santa Casa de Misericórdia Hospital and General Hospital, located in Fortaleza (Ceará – Brazil), were included in this study. The histological classification was done according to Lauren's classification.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) technique, adapted from Foster and Twell [25]. DNA extraction was done only in fragments with more than 80% of tumor cells. The DNA quality was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and the amount was determined using the NanoDrop™[®] 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

DNA bisulfite modification

Extracted DNA of tumor tissue was modified by sodium bisulfite to determine the methylation status of the *COX-2*, *MLH1*, and *CDKN2A* genes by MS-PCR, as previously described by Ferrasi et al. [26]. The primers targeted to study the promoter gene regions are described in Table 1. PCR was performed in 25 µL reaction volume, containing 1x Platinum Taq buffer, 3.0 mM MgCl₂ (*CDKN2A*) or 1.5 mM MgCl₂ (*MLH1* and *COX-2*), 0.4 mM dNTPs, and 0.64 µM (*CDKN2A*), 0.24 mM (*MLH1*) or 0.4 mM (*COX-2*) of each primer set, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase[®] (Invitrogen,

Foster, CA, USA), and 50 ng of treated DNA. Water and DNA from peripheral lymphocytes of healthy donors were used as negative controls. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and subsequently submitted to silver staining. For confirmation of the reaction specificity, MS-PCR products from the *COX-2*, *MLH1* and *CDKN2A* genes analyzed were cloned with a TOPO TA Cloning Kit® (Invitrogen, California, USA) and both the methylated and unmethylated PCR products were sequenced using an ABI PRISM® BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) and ABI Prism 3100 DNA Sequencer® (Applied Biosystems).

Table 1 - PCR primer sets used for MS-PCR.

Gene	Primer		Reference	Annealing (°C)	PCR product (bp)
	Forward	Reverse			
<i>COX-2</i>	M: TTAGATACGGCGGCGGCGGC	TCTTTACCCGAACGCTTCCG	27	59	161
	U: ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT	CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA		65	171
<i>MLH1</i>	M: TATATCGTTTCGTAGTATTCGTGT	TCCGACCCGAATAAACCCAA	28	66	153
	U: TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA		64	124
<i>CDKN2A</i>	M: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	29	70	150
	U: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA		70	151

M – Methylated; U – Unmethylated.

Detection of H. pylori infection and vacA alleles and the presence of cagA, cagE, virB11 and flaA genes

H. pylori infection was detected by amplification of the *ureC* gene using primers for PCR, as described by Lage et al. [30]. For the *H. pylori*-positive samples, the presence of the *vacA* alleles, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes were identified using the primer sets shown in Table 2.

Table 2 - PCR primer sets used for genotyping *H. pylori*.

Gene	Primer sequence	PCR (bp)	Reference
<i>ureC</i>	F- 5' AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T 3' R- 5' AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC 3'	294	Lage et al, 1995
<i>vacA</i>			
<i>s1/s2</i>	F- 5' ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC 3' R- 5' CTG CTT GAA TGC GCC AAA C 3'	(s1) 259 (s2) 286	
<i>m1</i>	F- 5' GGT CAA AAT GCG GTC ATG G 3' R- 5' CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC 3'	290	Atherton et al. 1995
<i>m2</i>	F- 5' GGA GCC CCA GGA AAC ATT G 3' R- 5' CAT AAC TAG CGC CTT GCA C 3'	192	
<i>cagA</i>	F- 5' ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A 3' R- 5' TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATA ACG CCA T 3'	297	Domingo et al., 1999
<i>cagE</i>	F- 5' TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC 3' R- 5' GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C 3'	509	Sozzi et al., 2005
<i>virB11</i>	F- 5' TTA AAT CCT CTA AGG CAT GCT AC 3' R- 5' GAT ATA AGT CGT TTT ACC GCT TC 3'	491	Sozzi et al., 2005

F- Forward; R- Reverse

PCR mixtures, for amplification of *cagE* and *virB11* and *flaA* genes, were prepared in a volume of 20 µL using Green MasterMix® (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions with the addition of 0.8% Tween 20 and 0.3 µM of each primer and 50 ng of the DNA sample. The *ureC*, *cagA*, *vacA s1/s2*, *vacA m1* genes were amplified in a 25 µL volume containing 2.5 µL of 10X PCR buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1% Tween 20, 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 200 µM dNTPs (Invitrogen), 1 U Platinum Taq polymerase® (Invitrogen), 0.4 µM (*ureC*, *cagA*, *vacA s1/s2*, *vacA m1*), 0.3 µM (*vacA m2*) for each primer and 50 ng of DNA sample. The PCR products were resolved by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The sample was considered *H. pylori* positive when an *ureC* fragment of 294 bp was amplified. For confirmation of the reaction specificity, PCR products from the *ureC* gene were cloned with TOPO TA Cloning Kit® (Invitrogen,

California, USA) and sequenced using an ABI PRISM BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems, California, USA) and an ABI Prism 3100 DNA Sequencer® (Applied Biosystems, California, USA). The *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes were considered positive when a specific fragment was detected (Table 2). DNase-free water was used as a negative control. DNA preservation has also been confirmed by amplification of different genes in other approaches under study in our laboratory. Random samples were reanalyzed to confirm the results.

Genotyping of interleukin polymorphisms

The genetic polymorphisms of *IL1B* (-511 C/T), *TNF* (-308 G/A) and *IL6* (-174 G/C) were detected by PCR-RFLP, and the *IL1RN* polymorphism was detected by PCR (Table 3).

Table 3 - PCR primer sets used for genotyping interleukin polymorphisms.

<i>SNP</i>	Primer sequence	Annealing (°C)	Size (bp) of PCR product	Reference
IL-1B (-511)	F 5'TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC3' R 5'GTT TAG GAA TCT TCC CACTT3'	55	304	35
IL1RN	F 5'CTCAGCAACACTCCTAT3' R 5'TCCTGGTCTGCAGGTAA3'	58	240, 326, 412, 484, 498	35
TNF-A (-308)	F 5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT3' R 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG3'	57	107	36
IL6 (-174)	F 5'TTGCAAGACATGCCAAAGTG3' R 5'TCAGACATCTCCAGTCCTATA3'	55	198	37

F- Forward; R- Reverse.

Statistical analyses

The statistical analyses were carried out using the SPSS® version 15.0 program (Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test. The results were considered statistically significant when the *p*-values were less than 0.05.

RESULTS

Study population

Of a total of 130 collected gastric tumor samples, 80 cases were available for analysis of methylation status. Of these, *H. pylori* infection was present in 75 cases. Among the *H. pylori* positive cases, the mean age was 64.5 years old; males were the most frequent (57.3%). Most tumors were located in the non-cardia region (73.3%) and 61.3% were classified as Lauren intestinal type.

Frequency of promoter CpG island methylation and of interleukin polymorphism genotypes

The presence of methylation in the promoter region of the genes *COX-2*, *MLH1* and *CDKN2A* was observed in 50.7% (38/75), 29.3% (22/75) and 44% (33/75) of the cases, respectively. The frequency of interleukin genotypes is shown in Table 4. All described genotypes for the *IL1RN* polymorphism were observed in this study. For statistical analysis, the genotypes were grouped according to the presence (*2) or absence (*L) of the short allele.

Table 4 – Frequencies of interleukin polymorphisms (N=75)

	Genotype	N (%)		Genotype*	N (%)
IL-1B (-511)	CC	24 (32.0%)	IL1RN	*2	24 (32.0%)
	CT	36 (48.0%)		*L	51 (68.0%)
	TT	15 (20.0%)			
	Genotype	N (%)		Genotype	N (%)
TNF (-308)	GG	58 (77.3%)	IL6 (-174)	GG	16 (21.3%)
	GA	16 (21.3%)		GC	27 (36.0%)
	AA	1 (1.3%)		CC	32 (42.7%)

*IL1RN*L – genotypes that have long alleles; IL1RN*2 – genotypes that have at least one short allele.

Associations between methylation status of promoter regions of COX-2, MLH1 and CDKN2A and interleukin polymorphism genotypes

The presence of methylation status of the genes studied were analyzed according to the interleukin genotypes, considering the general sample and also categorizing the tumor by anatomic site (cardia and non-cardia) and the histological type. In these analyses, a significant difference in *COX-2* promoter methylation status was found in the cardia tumors, where patients carrying the *IL1RN*2* allele were statistically more frequent in methylated tumors ($p=0.029$) than patients carrying the other *IL1RN* allele (*IL1RN*L*). On the other hand, considering the histological subtype, it was observed that, in the intestinal tumor type, the patients carrying the *IL1RN*2* allele showed a statistically higher frequency of methylated *COX-2* promoter region ($p=0.015$).

When the genotypes of *IL1B* and *IL1RN* polymorphisms were analyzed in combination, the methylated *COX-2* promoter gene was statistically more frequent in patients carrying *CT/TT – IL1RN*2* genotypes than in patients carrying the reference genotype, as shown in Table 5. Taking in account the potential inflammatory of the polymorphic allele, the combined genotypes *TT-IL1RN*L* or *CC-IL1RN*2* were considered as intermediate inflammatory. The analysis of the combined polymorphisms of *IL6* and *TNF* showed no statistical significance.

Table 5 – Difference in methylation status of genes *COX-2*, *MLH1* and *CDKN2A* genotype combinations between the polymorphisms *IL1B* and *IL1RN*

IL1B-IL1RN	COX-2				MLH1				CDKN2A			
	M	U	χ^2	P	M	U	χ^2	p	M	U	χ^2	p
<i>CC – IL1RN*L*</i>	2	9	-	-	3	8	-	-	4	7	-	-
<i>CT/TT – IL1RN*2</i>	23	15	6.12	0.013†	10	28	0.00	1.00	17	21	0.24	0.736
<i>TT - IL1RN*L</i>	9	7	3.91	0.109	6	10	0.31	0.692	8	8	0.49	0.695
<i>CC - IL1RN*2</i>												

* Reference genotype †Statistically significant

Influence of H. pylori genotype in the methylation process

Among the *H. pylori*-infected cases, 62.7% (47/75) were *cagA*+, 84.0% (63/75) *vacA s1*, 64.0% (48/75) *vacA s1m1*, 58.7% (44/75) *flaA*+, 49.3% (37/75) *cagE*+ and 56.0% (42/75) *virB11*+. The tables 6 and 7 show the analysis of the methylation status of the genes studied considering the above cited *H. pylori* genes and the patients' genotypes. From these analysis it were possible to observe that patients with the genotype combination CT/TT-IL1RN*2 and infected by *H. pylori cagA*+ or *vacA s1* had *COX-2* promoter region more frequently methylated than those with the reference genotype (CC-IL1RN*L). Also, the patients carrying genotypes which could expect to have an intermediate inflammation process (TT-IL1RN*L / CC-IL1RN*2) and infected by *H. pylori cagA*+ had also *COX-2* promoter region more frequently methylated than those with the reference genotype.

No significant results were found in analyzing the *cagE*, *flaA* and *virB11* genes. In the only 3 cases of *H. pylori*-negative samples, 66.7% (2/3) were *CDKN2A* methylated and all were *COX-2* methylated and *MLH1* unmethylated.

Table 6 – Difference in methylation status between patients infected with *cagA* positive and negative strains between the genotypic combinations of polymorphisms IL1B and IL1RN

IL1B - IL1RN	COX-2				MLH1				CDKN2A			
	M	U	χ^2	P	M	U	χ^2	p	M	U	χ^2	p
<i>cagA+</i>												
CC - IL1RN*L*	0	7	-	-	1	6	-	-	1	6	-	-
CT/TT - IL1RN*2	12	12	5.71	0.026 †	6	18	0.36	1.00	12	12	2.84	0.191
TT - IL1RN*L												
CC - IL1RN*2	5	5	4.96	0.044 †	3	7	0.57	0.602	3	7	0.57	0.602
<i>cagA-</i>												
CC - IL1RN*L*	2	2	-	-	2	2	-	-	3	1	-	-
CT/TT - IL1RN*2	11	3	1.27	0.532	4	10	0.64	0.568	5	9	1.94	0.274
TT - IL1RN*L												
CC - IL1RN*2	4	2	0.28	1.00	3	3	0.00	1.00	5	1	0.10	1.00

*Reference genotype †Statistically significant

Table 7 - Difference in methylation status between patients infected with *vacA sI* strains between the genotypic combinations of polymorphisms IL1B and IL1RN

<i>vacA sI</i>	COX-2				MLH1				CDKN2A			
	M	U	χ^2	P	M	U	χ^2	p	M	U	χ^2	p
CC - IL1RN*L*	2	8	-	-	3	7	-	-	4	6	-	-
CT/TT - IL1RN*2	21	11	6.40	0.025 †	10	22	0.01	1.00	13	19	0.00	1.00
TT - IL1RN*L												
CC - IL1RN*2	7	6	2.72	0.196	6	7	0.62	0.669	7	6	0.43	0.680

*Reference genotype †Statistically significant

When the analyses were carried out with the combined polymorphisms of *IL6* and *TNF*, it was found that when the patients were *GC-GA/AA* and *GG-GA/AA* carriers and infected with *H. pylori cagA+*, the genes *CDKN2A* and *MLH1* were significantly ($p= 0.031$; $p= 0.046$, respectively) unmethylated compared to the reference genotype *CC-GG* (Table 8). It is important to note that the six patients carrying the *GC-GA/AA* genotype, five presented the *CDKN2A* promoter methylated. No significant results were found in tests involving the *vacA*, *cagE*, *flaA* and *virB11* genotypes.

Table 8 – Difference in methylation status between patients infected with *cagA* positive and negative strains between the genotypic combinations of polymorphisms *IL6* and *TNF*

IL6 – TNF	COX-2				MLH1				CDKN2A			
	M	U	χ^2	<i>p</i>	M	U	χ^2	<i>P</i>	M	U	χ^2	<i>p</i>
<i>cagA+</i>												
<i>CC-GG*</i>	7	10	-	-	2	13	-	-	4	11	-	-
<i>CC-GA/AA</i>	0	2	1.30	0.508	1	1	1.63	0.330	0	2	0.70	1.00
<i>GC-GG</i>	4	10	0.53	0.707	4	10	1.02	0.389	7	7	1.67	0.195
<i>GC-GA/AA</i>	3	3	0.14	1.00	1	5	0.04	1.00	5	1	5.62	0.046†
<i>GG-GG</i>	6	3	1.53	0.410	4	5	2.90	0.150	3	6	0.12	1.00
<i>GG-GA/AA</i>	0	1	0.67	1.00	1	0	4.92	0.031†	0	1	0.36	1.00
<i>cagA-</i>												
<i>CC-GG*</i>	8	3			4	7	-	-	7	4	-	-
<i>CC-GA/AA</i>	2	2	0.68	0.560	2	2	0.23	1.00	2	2	0.23	1.00
<i>GC-GG</i>	3	3	0.88	0.600	2	5	0.12	1.00	2	4	1.43	0.334
<i>GC-GA/AA</i>	0	1	2.18	0.333	0	1	0.55	1.00	0	1	1.53	0.416
<i>GG-GG</i>	3	0	1.04	1.00	1	2	0.01	1.00	1	2	0.88	0.538
<i>GG-GA/AA</i>	2	1	0.04	1.00	0	3	1.53	0.505	2	1	0.01	1.00

*Reference genotype †Statistically significant

DISCUSSION

Some studies have examined the relationship between interleukin polymorphisms and CpG island methylation in patients with gastric cancer based on the fact that methylation is a consequence of the inflammation process [18;38-41]. Thus, polymorphisms that enhance the inflammation seem to be indirectly involved in the methylation process. Besides, the few published studies that found a relationship between interleukin polymorphisms and CpG island methylation were restricted to polymorphisms of only two interleukins, *IL1B* and *IL-17*, and all of them were conducted in Asian populations [13,14;41-43].

In this study, four polymorphisms of different genes (*IL-B*, *IL1RN*, *TNF* and *IL6*) were analyzed to verify the association between the presence of polymorphisms and methylation status of the two genes usually methylated in gastric cancer and other with a controversial issue. In our study any association was found considering all samples as one group. The only two studies that associated the polymorphism of *IL1B* and methylation, found an association of the T allele of *IL1B* with hypermethylation of CpG islands, however they analyzed different genes (*E-cadherin*, *MGMT* and *RUNX3*,) [13,14]. This difference also may be results to the studied population, since in these Asian studies, the polymorphic allele had a higher frequency than that found in our study.

It has been reported that the frequencies or levels of CpG island methylation of certain genes are dependent on the tumor anatomic site, supporting the notion hypothesis that cardiac tumors have different characteristics compared to non-cardiac tumors [44, 45]. Also, diffuse and intestinal histological subtypes tumors of show different pathways [46]. Thus, we analyzed the relationship between localization and histological subtype according to the patients' genotype considering each polymorphism independently. These analyses showed that in patients carrying the *IL1RN**2 allele and who had tumors located in the cardia region, the *COX-2* gene was more frequently methylated. In the study carried out by Alves et al. [19]

it was found that methylation in the promoter region of *COX-2*, *MLH1* and *CDKN2A* was dependent on the tumor location only for *MLH1*. Methylation of the *COX-2* promoter region was found in both sites. Although the study by Vo et al. [47] found no distinct methylation status for *CDKN2A* regarded to the tumor localization, recent studies carried out in Turkey [48] and Germany [49] correlate methylation of promoter *CDKN2A* to cardiac tumors, but the interleukin polymorphism influence was not assessed. Regarding to *COX-2* methylation no studies to date show that differences in the anatomical site of the tumor. When we analyzed the interactions between the interleukin polymorphisms, in combined genotypes of *IL1B* and *IL1RN*, considering the general sample, we found that in patients carrying the CT/TT – *IL1RN**2 genotypes, the *COX-2* promoter region were more frequently methylated. It is known that the genotype *IL1RN**2 increases the *IL1B* production and that the consequence is an increased inflammatory process in the gastric mucosa [7]. Thus, a genotype that promotes further inflammation (CT/TT – *IL1RN**2) seems to be responsible for CpG island methylation. On the other hand, the polymorphism of *TNF* was associated with the tumor histological subtypes. The results showed that patients carrying the *TNF* GG genotype (wild-type) with a diffuse tumor had *CDKN2A* more frequently unmethylated than those carrying the polymorphic allele (GA/AA). The allele G of the -308 G/A of *TNF* polymorphism is more associated with a lower production of TNF than the A allele [50]. The *TNF* -308 wild-type allele is involved in a lower inflammatory response and, therefore, shows a lower risk of developing gastric cancer, when compared to the polymorphic allele [5].

In order to observe the influence of *H. pylori* infection on the promoter methylation process, considering the polymorphisms studied, we analyzed five *H. pylori* virulence genes. The relevance of *H. pylori* in this process has been evidenced in studies showing that increased inflammation can trigger the epigenetic process [51]. Yoo et al. [52], in a study in which the methylation status of 25 genes was analyzed in chronic gastritis, observed that the number of

hypermethylated genes was significantly increased in *H. pylori*-infected samples. Besides the presence of bacteria, there also seems to be a relationship with the presence of certain virulence gene of *H. pylori* virulence genes. Kranzer et al. [53] showed in vitro the induction of a number of interleukins, including the ones we studied, with the presence of the genes *cagA*, *cagE* and *vacA*. Therefore, it seems that the methylation status is also influenced by the presence of *H. pylori* virulence genes.

In this study, although other virulence genes were analyzed, i.e., *cagE*, *flaA* and *virB11*, only *cagA* and *vacA* showed a relationship with promoter methylation. We found that in patients carrying the genotype combination CT/TT-*IL1RN**2 and infected by *H. pylori* *cagA*+ or *vacA* s1, the *COX-2* gene promoter region was more frequently methylated. This data is accordance with studies show that *H. pylori* *cagA*+ and *vacA* s1 are associated with an intense inflammatory process, with dense neutrophilic infiltrate in the gastric mucosa [31; 54,55]. Thus, patients with genotypes that predispose to an increased inflammatory response and infected by *H. pylori* *cagA*/*vacA* s1 would have a greater ability to methylate certain genes, such as *COX-2*. This data can provide one of the explanations for the significant frequency of methylated *COX-2* found by Alves et al. [19], who analyzed the same patients in the present study. The presence of methylated *COX-2* is a controversial issue in gastric carcinogenesis. Huang et al. [18] also found a similar frequency of methylated *COX-2* gene, and although some studies have proposed *COX-2* overexpression as a gastric tumorigenesis pathway [56], Huang et al. [18] suggests that the expression of this gene is not required for gastric carcinogenesis.

The analysis of combined genotypes of *IL6-TNF* involved small numbers. However, in patients carrying the *IL6-TNF* CC-GG genotype (lower inflammatory process) and showing the presence of *H. pylori* *cagA*+ strains, the genes *CDKN2A* and *MLH1* were statistically more frequently unmethylated than in GC-GA/AA and GG-GA/AA. Similarly, we also

observed that other combinations of genotypes containing *TNF* -308GG were more frequent in unmethylated tumors. These findings are consistent with other studies in which the presence of wild-type allele of *TNF* and the polymorphic allele of *IL6* was found to be associated with less inflammation process [37; 57].

In conclusion, DNA methylation in promoter regions of *COX-2* associated with *IL1RN*2* is suggested to be a cardia tumor characteristic. Furthermore, the combination *IL1B* 511T + *IL1RN*2* seems to be important in the methylation of *COX-2*, especially in the presence of more virulent *H. pylori* strains. Moreover, the non-methylation of *CDKN2A* in the diffuse tumors is apparently associated with the *TNF* -308GG genotype, and the associated genotypes of *IL6* and *TNF* CC+ GG seem to be implicated in the non-methylation of *CDKN2A* and *MLH1*, respectively, along with *H. pylori cagA+* infection. More studies with larger sample size, involving interleukin polymorphisms, DNA methylation and *H. pylori* infection are needed to extend our understanding of gastric carcinogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BRAZIL), grant number 480554/2008.

REFERENCES

1. IARC, International Agency for Research on Cancer. Evaluation of carcinogenic risk to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. 1994; 61: 1-241.
2. Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD. Helicobacter pylori urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory interleukin production. Gastroenterology 1996; 111:419–425.
3. Correa P. New strategies for the prevention of gastric cancer: Helicobacter pylori and genetic susceptibility. J Surg Oncol 2005; 90:134–138.
4. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various interleukins and development of severe mucosal inflammation by cag A gene positive *Helicobacter pylori* strains. Gut 1997; 41:442–451.
5. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory interleukin gene polymorphisms. Gastroenterology 2003; 124:1193–1201.
6. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. Annu Rev Immunol 1998; 16:27–55.
7. Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the *IL-1RA* allele 2 (*IL1RN*2*) is associated with enhanced IL1Beta production in vitro. Scand J Immunol 1998; 47:195–198.
8. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. Gastroenterology 2002; 123:92–105.
9. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 2000; 404:398–402.
10. Machado JC, 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-1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. Gastroenterology 2001; 121:823–829.
11. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. Gastroenterology 2003; 125:364–371.

12. Gatti LL, Zambaldi-Tunes M, de Lábio RW, Silva LC, Cardoso-Smith MA, Marques-Payão SL. Interleukin-6 polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in Brazilian adult patients with chronic gastritis. *Clin Exp Med* 2005; 5:112–116.
13. Chan AO, Chu KM, Huang C, Lam KF, Leung SY, Sun YW, Ko S, Xia HH, Cho CH, Hui WM, Lam SK, Rashid A. Association between *Helicobacter pylori* infection and interleukin 1 beta polymorphism predispose to CpG island methylation in gastric cancer. *Gut* 2007; 56:595–597.
14. Yoo EJ, Park SY, Cho NY, Kim N, Lee HS, Kim D, Kang GH. Influence of IL1B polymorphism on CpG island hypermethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer. *Virchows Arch* 2010; 456:647–652.
15. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arai K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D, Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 2006; 12:989–995.
16. Cho NY, Kim BH, Choi M, Yoo EJ, Moon KC, Cho YM, Kim D, Kang GH. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J Pathol* 2007; 211:269–277.
17. Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS, Kim H. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11:3834–3841.
18. Huang L, Zhang KL, Li H, Chen XY, Kong QY, Sun Y, Gao X, Guan HW, Liu J. Infrequent COX-2 expression due to promoter hypermethylation in gastric cancers in Dalian, China. *Hum Pathol* 2006; 37:1557–1567.
19. Alves MK, Ferrasi AC, Lima VP, Ferreira MV, Pardini, MIMC, Rabenhorst SHB. Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A gene by promoter methylation in gastric cancer: relationship with histological subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotype. *Pathobiology* 2011; 78:266–276.
20. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002; 8:289–293.
21. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83:493–501.
22. Jackson LM, Wu KC, Mahida YR, Jenkins D, Hawkey CJ. Cyclooxygenase 1 and 2 in normal, inflamed and ulcerated human gastric mucosa. *Gut* 2000; 47:762–770.
23. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclooxygenase- 2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1998; 69:168–172.

24. Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, Chan FK. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000; 157:729–735.
25. Foster GD, Twell DJ. *Plant gene isolation: principles and practice*. England: Wiley; 1996.
26. Ferrasi AC, Pinheiro NA, Rabenhorst SH, Caballero OL, Rodrigues MA, de Carvalho F, Leite CV, Ferreira MV, Barros MA, Pardini MI. *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2010; 16:312-319.
27. Akhtar M, Cheng Y, Magno RM, Ashktorab H, Smoot DT, Meltzer SJ, Wilson KT. Promoter methylation regulates *Helicobacter pylori*-stimulated cyclooxygenase-2 expression in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2001; 61:2399–2403.
28. Kang GH, Shim YH, Ro JY. Correlation of methylation of the HMLH1 promoter with lack of expression of HMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest* 1999; 79:903–909.
29. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:9821–9826.
30. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, Glupczynski Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2752–2756.
31. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270:17771–17777.
32. Domingo D, Alarcon T, Pietro N, Sanchez I, Lopez-Brea M. *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2113–2114.
33. Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, Figura N, De Paoli P. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *J Lab Clin Med* 2005; 146:262–270.
34. Göttke MU, Fallone CA, Barkun AN, Vogt K, Loo V, Trautmann M, Tong JZ, Nguyen TN, Fainsilber T, Hahn HH, Körber J, Lowe A, Beech RN. Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. *J Infect Dis* 2000; 181:1674–1681.
35. Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Potential influence of interleukin-1 haplotype IL-1 beta-511*T-IL1RN*1 in conferring low risk to middle third location of esophageal cancer: a case-control study. *Hum Immunol* 2008; 69:179–186.
36. Karplus TM, Jeronimo SM, Chang H, Helms BK, Burns TL, Murray JC, Mitchell AA, Pugh EW, Braz RF, Bezerra FL, Wilson ME. Association between the tumor necrosis factor

- locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infect Immun* 2002; 70:6919–6925.
37. Fernandes-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 polymorphisms and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1334–1339.
38. Lima EM, Leal MF, Burbano RR, Khayat AS, Assumpção PP, Bello MJ, Rey JA, Smith MA, Casartelli C. Methylation status of ANAPC1, CDKN2A and TP53 promoter genes in individuals with gastric cancer. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41:539–543.
39. Arai T, Kasahara I, Sawabe M, Honma N, Aida J, Tabubo K.. Role of methylation of the *hMLH1* gene promoter in the development of gastric and colorectal carcinoma in the elderly. *Geriatr Gerontol Int* 2010; 10:S207–S212.
40. Ayed-Guerfali BD, Benhaj K, Khabir A, Abid M, Bayrouiti MI, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Hypermethylation of tumor-related genes in Tunisian patients with gastric carcinoma: clinical and biological significance. *J Surg Oncol* 2011; 103:687–694.
41. Lim B, Ju H, Kim M, Kang C. Increased genetic susceptibility to intestinal-type gastric cancer is associated with increased activity of the RUNX3 distal promoter. *Cancer* 2011; doi: 10.1002/cncr.2616.
42. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. Effect of polymorphisms of IL-17A, -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. *Int J Mol Med* 2009; 24:563–569.
43. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, Yonemura J, Maeda Y, Maruyama N, Kamano T, Kamiya Y, Fujita H, Nakagawa Y, Nagasaka M, Iwata M, Hirata I, Arisawa T. Association between IL-17A, -17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer. *Int J Mol Med* 2010; 25:471–477.
44. Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004; 111:224–228.
45. Ksaa F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 2009; 404:128–133.
46. Carneiro F, Huntsman DG, Smyrk TC, Owen DA, Seruca R, Pharoah P, Caldas C, Sobrinho-Simões M. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *J Pathol* 2004; 203: 681–687.
47. Vo QN, Geradts J, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. CDKN2A promoter methylation in gastric adenocarcinomas: clinical variables. *Hum Pathol* 2002; 33:1200–1204.

48. Ksiai F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 2009; 404:128–133.
49. Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004; 111:224–228.
50. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism affects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34:391–399.
51. Feinberg AP, Ohisson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7:21–33.
52. Yoo EJ, Park SY, Cho NY, Kim N, Lee HS, Kang GH. *Helicobacter pylori*-infection-associated CpG island hypermethylation in the stomach and its possible association with Polycomb repressive marks. *Virchows Arch* 2008; 452:515–524.
53. Kranzer K, Söllner L, Aigner M, Lehn N, Deml L, Rehli M, Schneider-Brachert W. Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors and compounds on activation and maturation of human dendritic cells. *Infect Immun* 2005; 73:4180–4189.
54. Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112:92–99.
55. Shiotani A, Nurgalieva ZZ, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori*. *Med Clin North Am* 2000; 84:1125–1136.
56. Mrena J, Wiksten JP, Kokkola A, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. COX-2 is associated with proliferation and apoptosis markers and serves as an independent prognostic factor in gastric cancer. *Tumour Biol* 2010; 31:1-7.
57. Beales IL, Calam J. Interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 1998; 42:227–234.

4. ARTIGO II

A ser submetido à International Immunology

Fator de Impacto: 3.301 – Qualis B1 (Ciências Biológicas III)

Em elaboração

***Helicobacter pylori* and Interleukin Polymorphisms in Gastric Cancer Development**

Débora Menezes da Costa¹, Silvia Helena Barem Rabenhorst^{1*}

¹Universidade Federal do Ceará
Department of Pathology and Forensic Medicine
Rua Cel. Nunes de Melo, 1315
Porangabussu - CEP 60183-630
Fortaleza, Brazil.

*Silvia Helena Barem Rabenhorst

Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina

Departamento de Patologia e Medicina Legal

Rua Cel. Nunes de Melo, 1315

Porangabussu CEP 60183-630

Fortaleza/CE, Brazil.

Tel.: +55 (85) 3366.8639

Fax: +55 (85) 3267.3840

e-mail: srabenhorst@ hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to determine the associations between the polymorphisms of interleukins and the *H. pylori* strains influence involved in gastric tumors cases. DNA extracted from 119 gastric tumor samples was available for interleukin polymorphism genotyping by PCR-RFLP, *H. pylori* detection and subtyping (*cagA*, *cagE*, *virB11* and *vacA* genes) by PCR. The patients aged ≥ 65 years were predominantly of male gender (77,5%; $p=0.022$), presenting a positive correlation. ($r=0.198$, $p=0.037$). A positive correlation was also found between the age group 55-64 and women ($r=0.217$, $p=0.021$). Related to histological subtype, diffuse tumors were correlated with younger patients (15-44 years, $r=0.207$, $p=0.033$) and intestinal subtype with older patients (≥ 65 , $r=0.296$, $p=0.017$). The diffuse subtype was also correlated with the female while the male intestinal subtype ($r=0.226$, $p=0.019$). A significantly correlation was found between the *IL6* -174 C allele (GC+CC) and the age 15-44 ($r=-0.193$; $p=0.041$) and this allele was statically more frequent ($p=0.049$) than -174 G allele in patients with age ≥ 65 years. In the genotype association of *IL6* and *TNF* polymorphisms the high virulence strains have been observed in all genotypes of *TNF* and *IL6* polymorphisms, and the low virulent strains was more frequent in the genotype GC+GG. The infection with a *H. pylori* low virulent can leads to the gastric cancer development when the hosts' inflammatory response is exacerbated, based on the genetic polymorphism of *IL6* -174G/C.

INTRODUCTION

Gastric cancer represents the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer-related death worldwide (1). Adenocarcinoma, the most common gastric cancer type, depending on the localization (distal – antrum or body; proximal – cardia) and the histological types (intestinal and diffuse, according to Lauren's classification) have different epidemiological, pathobiological characteristics and distinct carcinogenetic pathways (2,3).

The etiological role of *Helicobacter pylori* in chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer has been clearly recognized, although more than 50% of the population has been reported to be infected by *H. pylori*, only 1-2% will develop gastric cancer (4). The reasons for the divergent clinical outcomes remain poorly understood, but it is thought that host, bacterial and environmental factors contribute to this process.

Some virulence factors of *H. pylori* are frequently associated with the most serious clinical outcomes and pathogenic bacteria. The presence of the pathogenic island *cag* (*cag*-PAI), which encodes the secretion system type IV, can be recognized by some markers of virulence as *cagA*, *cagE* and *virB11* genes (5) and *cagA* was related to severe inflammation, gastric ulcers and tumors in Mongolian gerbil models (6). Another important *H. pylori* virulence factor is the *vacA* gene that produces a secreted protein which induces apoptosis, partly by forming pores in the mitochondrial and cytoplasm membrane, thereby allowing the efflux of cytochrome c (7). This gene consists in two main polymorphic regions (signal- s1 and s2; and the middle- m1 and m2), that may comprise any combination of signal and mid-region types. The s1/m1 *H. pylori* strains produce a more toxic protein and are more likely to cause disease (8).

The inflammation process caused by *H. pylori* infection is suggested as mechanism in which *H. pylori* can cause cancer (8). The local inflammation in *H. pylori* infection is

characterized by infiltration of neutrophils and specific lymphocytes into the gastric mucosa as well as by increased production of several cytokines. These cytokines expression can vary at least partly by polymorphisms in the genes that encode the respective proteins (3).

The pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF) plays an important role in the inflammatory process and have a functional promoter polymorphism in the *TNF* -308 G/A. The *TNF* -308*A allele is thought to increase the production of TNF and has been found to influence the risk of *H. pylori*-induced gastritis and gastric cancer (9,10).

Another important interleukin is the IL6, a multifactorial cytokine that is produced by immune and nonimmune cells, such as, monocytes, lymphocytes, macrophages, endothelial cells, intestinal epithelial cells, and osteoclasts. IL6 functions as an inflammatory mediator and also regulates endocrine and metabolic functions (11). The functional promoter polymorphism *IL6* -174 G/C is reported to be involved in the pathogenesis of gastric diseases and the *IL6* -174*G allele have been found to produce high levels of IL6 (12,13). In Brazilian population the inheritance of this allele was found to be associated with an elevated risk of gastric cancer (14), however the relationship of these polymorphism and *H. pylori* genotype is poorly understood, thus, the aim of this study was to verify the associations between the virulence factors of *H. pylori* and the *TNF* -308 G/A and *IL6* -174 G/C polymorphisms in the gastric carcinogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The present study was approved by the Hospital Ethics Committee in the Federal University of Ceará, Brazil, and all subjects signed the informed consent form before inclusion. A total of 119 tumor samples of *H. pylori*-positive patients who had undergone gastrectomy at University Hospital Walter Cantídeo, Santa Casa de Misericórdia Hospital and General Hospital, located in Fortaleza (Ceará – Brazil) were included in this study. The histological classification was done according to Lauren's classification by two pathologists of the team.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) technique, adapted from Foster and Twell (15). The DNA extraction was done only in fragments that showed more than 80% of tumor cells. The DNA quality was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and the amount was determined using the NanoDrop™[®] 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA).

Detection of H. pylori infection and vacA alleles and the presence of cagA, cagE and virB11 genes

H. pylori infection was detected by amplification of the *ureC* gene using primers for PCR, as described by Lage et al. (16). For the *H. pylori*-positive samples, the presence of the *vacA* alleles, *cagA*, *cagE* and *virB11* genes were identified using the primer sets showed in Table 1.

Table 1 - PCR primer sets used for genotyping *H. pylori*.

Gene	Primer sequence	PCR (bp)	Reference
<i>ureC</i>	F- 5' AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T 3' R- 5' AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC 3'	294	(16)
<i>vacA</i>	<i>s1/s2</i> F- 5' ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC 3' R- 5' CTG CTT GAA TGC GCC AAA C 3'	(s1) 259 (s2) 286	
	<i>m1</i> F- 5' GGT CAA AAT GCG GTC ATG G 3' R- 5' CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC 3'	290	(17)
	<i>m2</i> F- 5' GGA GCC CCA GGA AAC ATT G 3' R- 5' CAT AAC TAG CGC CTT GCA C 3'	192	
<i>cagA</i>	F- 5' ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A 3' R- 5' TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATA ACG CCA T 3'	297	(18)
<i>cagE</i>	F- 5' TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC 3' R- 5' GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C 3'	509	(19)
<i>virB11</i>	F- 5' TTA AAT CCT CTA AGG CAT GCT AC 3' R- 5' GAT ATA AGT CGT TTT ACC GCT TC 3'	491	(19)

F- Forward; R- Reverse

PCR mixtures, for amplification of *cagE* and *virB11* genes, were prepared in a volume of 20 μ L using Green MasterMix® (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions with addition of 0.8% Tween 20 and 0.3 μ M of each primer and 50ng of the DNA sample. The *ureC*, *cagA*, *vacA s1/s2*, *vacA m1* genes were amplified in a 25 μ L volume containing 2.5 μ L of 10X PCR buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1% Tween 20, 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen), 200 μ M of dNTPs (Invitrogen), 1 U of Platinum Taq polymerase® (Invitrogen), 0.4 μ M (*ureC*, *cagA*, *vacA s1/s2*, *vacA m1*), 0.3 μ M (*vacA m2*) for each primer and 50 ng of DNA sample. The PCR products were resolved by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. The sample was considered *H. pylori* positive when an *ureC* fragment of 294bp was amplified. For confirmation of the reaction specificity, PCR products from the *ureC* gene were cloned in TOPO TA Cloning Kit® (Invitrogen, California, USA) and sequenced using an ABI PRISM BigDye Terminator

v.3.0 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems, California, USA) and an ABI Prism 3100 DNA Sequencer® (Applied Biosystems, California, USA). The *vacA*, *cagA*, *cagE*, *virB11* and *flaA* genes were considered positive when a specific fragment was detected (Table 2). DNase-free water was used as a negative control. DNA preservation has also been confirmed by amplification of different genes in other approaches under study in our laboratory. All negative *H. pylori* genes and 10% of random samples were reanalyzed to confirm the results

Genotyping of interleukin polymorphisms

The genetic polymorphisms of *TNF* (-308 G/A) and *IL6* (-174 G/C) were detected by PCR-RFLP, as previously described (Table 2).

Table 2 - PCR primer sets used for genotyping interleukin polymorphisms.

Gene	Primer sequence	PCR (bp)	Enzyme Restriction	Referência
<i>TNF</i>	F - 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3' R - 5' TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG 3'	107	<i>NcoI</i>	(20)
<i>IL6</i>	F - 5' TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG T 3' R - 5' CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG 3'	198	<i>SfaNI</i>	(21)

F- Forward; R- Reverse.

Statistical analyzes

The statistical analyses were carried out using the SPSS® version 15.0 program (Chicago, IL, USA). Statistically significant differences were evaluated by the chi-square test (χ^2) or Fisher exact test. The results were considered statistically significant when the *p*-values were less than 0.05.

RESULTS

Clinical and demographic characteristics of patients

The median age of patients was 65 years, ranging from 23 to 92 years. Epidemiological data of the study group are shown in Table 3. A positive correlation was found between male and patients aged ≥ 65 years ($r= 0.198$, $p= 0.037$). In fact, among patients aged ≥ 65 years, male sex was predominant (77,5%; $p= 0.022$). On the other hand, a positive correlation was found between the age group 55-64 and women ($r= 0.217$, $p= 0.021$). Age was also correlated with the histological subtype, where the diffuse subtype were correlated with younger patients (15-44 years of age, $r= 0.207$, $p= 0.033$) and intestinal subtype with older patients (≥ 65 , $r= 0.296$, $p= 0.017$). The diffuse subtype was also correlated with the female while the male intestinal subtype ($r= 0.226$, $p= 0.019$).

Table 3. Clinical and demographic data of patients with gastric adenocarcinoma

Demographic data (n= 119)	N (%)
Age	
0-14	-
15-44	10 (8.4)
45-54	17 (14.3)
55-64	30 (25.2)
≥ 65	62 (52.1)
Sex	
Male	81 (68.1)
Female	38 (31.9)
Clinical data	
Tumor stage	
I	15 (12.8)
II	28 (23.9)
III	35 (29.9)
IV	39 (33.3)
Lauren's classification	
Intestinal	62 (52.1)
Diffuse	57 (47.9)

Helicobacter pylori virulence genes and *IL6* and *TNF* polymorphisms

H. pylori infection was present in 94.1% (112/119) of patients. Among them, 64.3% (72/112) were *cagA*+, 86.6% (97/112) *vacA s1*, 68.8% (77/112) *vacA s1m1*, 47.3% (53/112) *cagE*+ and 56.3% (63/112) *virB11*+.

The frequencies of polymorphisms studied are showed in Table 4 and were in the Hardy-Weinberg equilibrium (*TNF* $p= 0.899$; *IL6* $p= 0.108$). The genotype distribution according to the age is showed in the Figure 2. From this figure it is possible to observe a significantly correlation (Figure 2a) between the *IL6* -174 C allele (GC+CC) and the age 15-44 ($r= -0.193$; $p= 0.041$) and this allele was statically more frequent ($p= 0.049$) than -174 G allele in patients with age ≥ 65 years. On the other hand, an homogeneous distribution was found of the wild-type allele -308 *TNF* GG, with one major difference between the frequencies being found in the age group without statistical significance (Figure 2b).

Table 4 – Genotypes frequency of *IL6* -174 G/C and *TNF* -308 G/A polymorphisms (n=119).

Cytokine Polymorphisms	Genotype Frequency N (%)
<i>IL6</i> -174 G/C	
GG	24 (20.2)
GC	49 (41.2)
CC	46 (38.7)
<i>TNF</i> -308 G/A	
GG	97 (81.5)
GA	21 (17.6)
AA	1 (0.8)

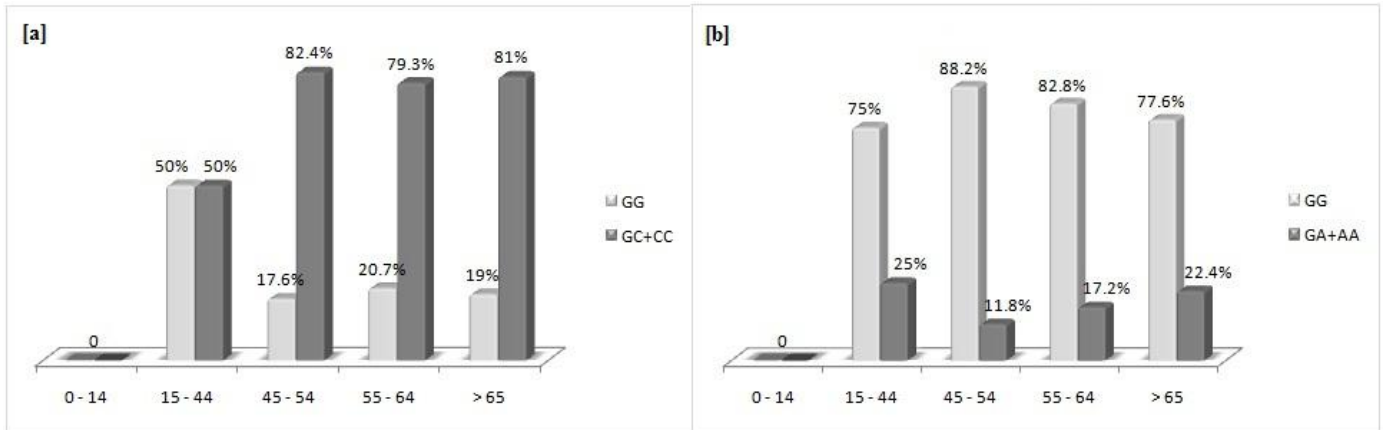


Figure 2. Frequency distribution of polymorphisms of [a] *IL6* -174 G/C and [b] *TNF* -308 G/A into age groups.

Relationship between H. pylori infection and vacA, cagA, cagE and virB11 genes with interleukin polymorphisms in gastric adenocarcinoma

When these data were analyzed according to *H. pylori* genes, a positive correlation between patients carrying the *IL6* -174 GC genotype and the less virulent *vacA* s2m1 allele ($r= 0.309$; $p= 0.001$) was found. To investigate the relationship between *H. pylori* infection and the presence of *vacA* alleles, *cagA*, *cagE* and *virB11* genes in gastric tumorigenesis, the cases were divided into two groups according to *vacA* alleles. Subsequently each group was subdivided into four subgroups according to the integrity of *cag*-PAI, considering the studied genes. The cases which no presented and *cag*-PAI genes were classified as *cag*-PAI(-). These groups, their frequencies and polymorphism genotypes are shown in Table 5. In these analysis, correlations were also found between patients carrying the *IL6* -174 CC genotype and *H. pylori* from 1c group ($r= 0.225$; $p= 0.017$) and between patients carrying the *IL6* -174 GC and *H. pylori* from 1c ($r= -0.215$; $p= 0.023$) and 2c groups ($r= 0.204$; $p= 0.031$).

Table 5 - *H. pylori* infection cases in gastric cancer divided according to *H. pylori* and polymorphisms interleukin genotypes.

	<i>IL6 -174 G/C</i>			<i>TNF -308 G/A</i>			Total
	GG	GC	CC	GG	GA	AA	
Genotype distribution (%)	24/112 (21.4)	46/112 (41.1)	42/112 (37.5)	90/112 (80.3)	21/112 (18.8)	1/112 (0.9)	
1 Group: <i>vacAs1m1/s1m2</i>							
1a: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+) (%)	8/24 (33.3)	19/46 (41.3)	11/42 (26.2)	33/90 (36.7)	4/21 (19)	1/1 (100)	38
1b: <i>cagA</i> (+) and <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+) (%)	4/24 (16.7)	8/46 (17.4)	6/42 (14.3)	15/90 (16.7)	3/21 (14.3)	-	18
1c: <i>cagA</i> (+) or <i>cagE</i> (+) or <i>virB11</i> (+) or <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+) (%)	5/24 (20.8)	5/46 (10.8)	14/42 (33.3)	19/90 (21.1)	5/21 (23.8)	-	24
1d: <i>ureC</i> (+) (%)	6/24 (25)	5/46 (10.8)	6/42 (14.3)	13/90 (14.5)	4/21 (19)	-	17
2 Group: <i>vacA s2m1/s2m2</i>							
2a: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+) (%)	-	-	-	-	-	-	-
2b: <i>cagA</i> (+) and <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) and <i>virB11</i> (+) (%)	-	1/46 (2.2)	2/42 (4.7)	2/90 (2.2)	1/21 (4.7)	-	3
2c: <i>cagA</i> (+) or <i>cagE</i> (+) or <i>virB11</i> (+) or <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+) (%)	-	5/46 (10.8)	1/42 (2.4)	5/90 (5.5)	1/21 (4.7)	-	6
2d: <i>ureC</i> (+) (%)	1/24 (4.2)	3/46 (6.6)	2/42 (4.7)	3/90 (3.3)	3/21 (14.3)	-	6
Total	24	46	42	90	21	1	112

The Figure 3 shows the genotype polymorphisms distribution considering *H. pylori* virulence. As high virulence strain, it was considered *H. pylori* classified in 1a to 1d groups, and low virulence strain, *H. pylori* classified in 2a to 2d groups.

In the genotype association of *IL6* and *TNF* polymorphisms the high virulence strains have been observed in all genotypes of *TNF* and *IL6* polymorphisms, and the low virulent strains was more frequent in the genotype GC+GG (intermediate inflammation) (Figure 3c) and one interesting fact is that around 60% of this low virulence strains were *cagA*+. Although in Figure 3d, can be observed that in all genotypes there is a high frequency of infection with strains of high virulence. When the analyzes were made according to the presence of inflammatory alleles, the frequency of high virulent strains decreased with the allele number (Figure 4).

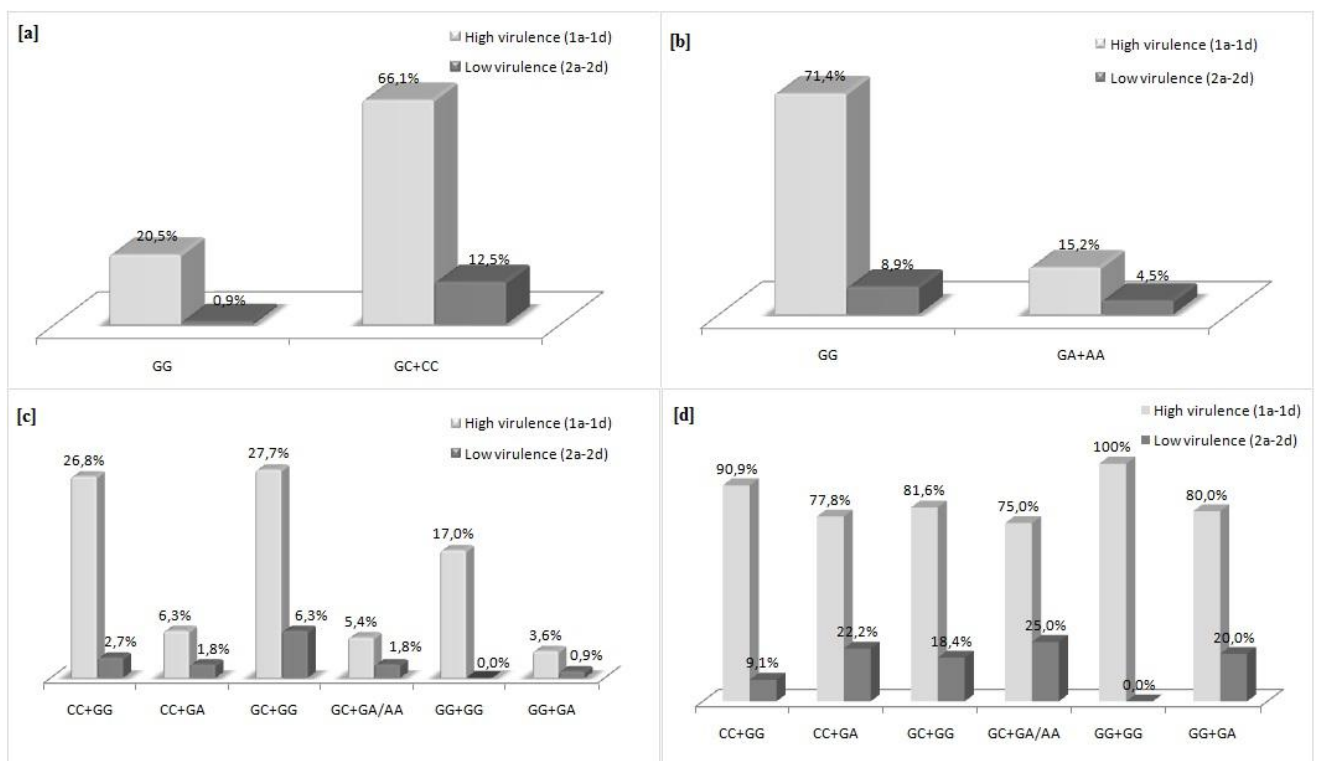


Figure 3. Frequency distribution of polymorphisms of [a] *IL6* -174 G/C; [b] *TNF* -308 G/A, [c] and [d] *IL6* + *TNF* according to *H. pylori* virulence.

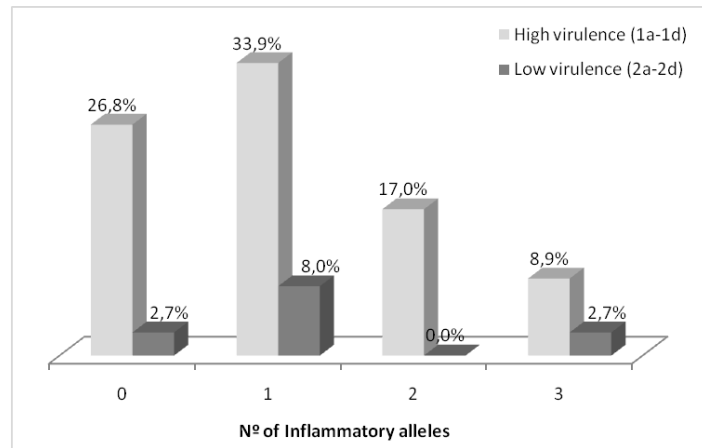


Figure 4. Frequency distribution of number of inflammatory alleles (*IL6* -174 G/C and *TNF* -308 G/A polymorphisms) according to *H. pylori* virulence.

DISCUSSION

A high incidence of gastric adenocarcinoma is found in Ceará state and this state is among the five with the highest incidence (22). As described in the literature, in this study the patients with gastric adenocarcinoma were more frequent in older age group and were mostly male (23-25). On the histological subtype, the results also corroborate other studies in which the diffuse subtype is more common in females, and often occurs in younger patients. Since the intestinal subtype is more common in men, and increases significantly in incidence with age (26).

Some studies have demonstrated the high incidence of *H. pylori* infection in patients with gastric cancer and as expected, this close association was observed in this study. Similar frequencies observed in this study (94%) have been found in other Brazilian studies from the North region, and in studies from Italy and Turkey (24, 27,28). Also, the frequencies of *cagA* and *vacA s1m1* genes were similar to other studies (29,30). There are few studies of *cagE* gene (31,32) and none linking the presence of gastric cancer to *virB11*, except for studies of our group (5,33).

Several studies have described an association between *H. pylori cagE* and *virB11* genes and gastritis, duodenal ulcer, peptic ulcer disease (19,34). These genes are involved in encoding major proteins of type IV secretion system and inducing the secretion of cytokines.

The frequency of the *TNF* polymorphic allele (-308 A) in patients with gastric cancer in this study was similar to patients from 10 Europe countries (35), but less frequent than others from Brazil, USA and Korea (9,24,36) and more frequent than some Asian studies (37-39). Considering the frequency of *IL6* polymorphic homozygous genotype (-174 CC), the frequencies found in this study was higher than all studies that analyzed the same polymorphism, including a Brazilian study (9,14,40,41).

One interesting finding was the higher frequency of patients carrying the allele -308A *TNF* in patients aged ≥ 65 years and a negative correlation between the allele *IL6* -174 C and the age group of 15-44 years. This allele (-308A) is those responsible for a greater inflammatory response (12,42), which associated to others factors could lead to the gastric cancer development. Usually, in the polymorphism analysis the age is not considered, however it could add data for understanding the increase of the frequency of cancer in this age group.

In the gastric cancer, *H. pylori* infection is considered a trigger of inflammatory process. In this study it was observed that gastric cancer patients carrying the genotype -174 GC of *IL6* were associated with strain *vacA* s2m1. The influence of the host genotype and *H. pylori* strain in the development of gastric cancer was accessed, through the grouping cases according to *vacA* alleles and *cag*-PAI integrity and our findings about the correlation of interleukin genotypes and *H. pylori* virulence showed that the polymorphic genotype of *IL6* -174 CC, involved in a lower inflammatory response, was correlated to high virulent strains, whereas the heterozygous genotype -174 GC (higher inflammatory response than -174 CC genotype) was correlated to low virulent strains. Studies showed that infection with *cag*-PAI-positive strains stimulate a higher secretion of pro-inflammatory interleukins compared with *cag*-PAI-negative strains (43), independently of host genotype. Thus, the presence of a genotype that leads to a higher inflammation appears to influence the outcome of infection by a strain of lower virulence. In such cases, although there is no presence of bacterial products known to stimulate the secretion of interleukins, there is recognition and response by the host immune system, which in the presence of polymorphism can be amplified and exacerbate the inflammatory response.

In conclusion, based on this analysis of the genetic polymorphisms of *IL6* and *TNF*, our findings demonstrate a significant positive association between *IL6* -174CC and high

virulent strains (1c group) and the wild-type allele in the *IL6* -174GC genotype with low virulent strains (2c group). Therefore, these results suggest that an infection with a *H. pylori* low virulent can lead to the gastric cancer development when the hosts' inflammatory response is exacerbated, based on the genetic polymorphism of *IL6*.

REFERENCES

- 1 Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. 2005. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin.* 55:74–108.
- 2 Peek, R. M. Jr. and Blaser, M. J. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2:28-37.
- 3 Kim, S. S., Ruiz, V. E., Carroll, J. D. and Moss, S. F. 2011. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Letters.* 305:228–238.
- 4 Wen, S. and Moss, S. F. 2009. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.* 282:1–8.
- 5 Lima, V. P., de Lima, M. A. P., Ferreira, M. V. P., Barros, M. A. P. and Rabenhorst, S. H. B. 2010. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *Int J Infect Dis.* 14:613–617.
- 6 Franco, A. T., Johnston, E., Krishna, U. et al. 2008. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res.* 68:379-387.
- 7 Blaser, M. J. and Atherton, J. C. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 113:321–333.
- 8 Atherton, J. C. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol.* 1:63–96.
- 9 El-Omar, E. M., Rabkin, C. S., Gammon, M. D. et al. 2003. Increased Risk of Noncardia Gastric Cancer Associated With Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms. *Gastroenterology.* 124:1193–1201.
- 10 Machado, J. C., Figueiredo, C., Canedo, P. et al. 2003. A Proinflammatory Genetic Profile Increases the Risk for Chronic Atrophic Gastritis and Gastric Carcinoma. *Gastroenterology.* 125:364–371.
- 11 Lauta, V. M. 2001. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine.* 16:79–86.
- 12 Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R. et al. 1998. The Effect of Novel Polymorphisms in the Interleukin-6 (IL6) Gene on IL6 Transcription and Plasma IL6 Levels, and an Association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis. *J Clin Invest.* 102:1369–1376.
- 13 Sugimoto, M., Yamaoka, Y. and Furuta, T. 2010. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol.* 16:1188-1200.
- 14 Gatti, L. L., Burbano, R. R., Zambaldi-Tunes, M. et al. 2007. Interleukin-6 Polymorphisms, *Helicobacter pylori* Infection in Adult Brazilian Patients with Chronic Gastritis and Gastric Adenocarcinoma. *Arch Med Research.* 38:551-555.

- 15 Foster, G. D. and Twell, D. J. *Plant gene isolation: principles and practice*. England: Wiley; 1996.
- 16 Lage, A. P., Godfroid, E., Fauconnier, A. et al. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 33:2752-2756.
- 17 Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M. Jr. et al. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 270:17771–17777.
- 18 Domingo, D., Alarcon, T., Pietro, N., Sanchez, I. and Lopez-Brea, M. 1999. *cagA* and *vacA* status of Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 37:2113–2114.
- 19 Sozzi, M., Tomasini, M. L., Vindigni, C. et al. 2005. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *J Lab Clin Med.* 146:262–270.
- 20 Karplus, T. M., Jeronimo, S. M., Chang, H. et al. 2002. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infect Immun.* 70:6919-6925.
- 21 Fernandes-Real, J. M., Broch, M., Vendrell, J., Richart, C. and Ricart, W. 2000. Interleukin-6 polymorphisms and lipid abnormalities in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:1334–1339.
- 22 INCA. Estimativas 2012. In <<http://www.inca.gov.br>>. Last access in december 8, 2011
- 23 Lu, W., Pan, K., Zhang, L., et al. 2005. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor a and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis.* 26:631-636.
- 24 Melo Barbosa, H. P., Martins, L. C., dos Santos, S. E. B. et al. 2009. Interleukin-1 and TNF polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population *World J Gastroenterol.* 15:1465-1471.
- 25 Deans, C., Yeo, M. S. W., Soe, M. Y., et al. 2011. Cancer of the Gastric Cardia is Rising in Incidence in an Asian Population and is Associated with Adverse Outcome. *World J Surg.* 35:617–624.
- 26 Lochhead, P. and El-Omar, E. M. 2008. Gastric cancer. *British Medical Bulletin.* 85: 87–100.
- 27 Saribasak, H., Salih, B. A., Yamaoka, Y. and Sander, E. 2004. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol.* 42:1648–51.
- 28 Perri, F., Piepoli, A., Bonvicini, C. et al. 2005. Cytokine gene polymorphisms in gastric cancer patients from two Italian areas at high and low cancer prevalence. *Cytokine.* 30:293-302.

- 29 Alarcon, T., Domingo, D., Martinez, M. J. and Lopez-Brea, M. 1999. *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 24:215-219.
- 30 Letley, D. P., Rhead, J. L., Twells, R. J., Dove, B., Atherton, J. C. 2003. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 278:26734–41.
- 31 Ghasemi, A., Shirazi, M. H., Ranjbar, R. et al. 2008. The prevalence of *cagA* and *cagE* genes in *Helicobacter pylori* strains isolated from different patient groups by polymerase chain reaction. *Pak J Biol Sci*. 11:2579-83.
- 32 Dabiri, H., Maleknejad, P., Yamaoka, Y. et al. 2009. Distribution of *Helicobacter pylori* *cagA*, *cagE*, *oipA* and *vacA* in different major ethnic groups in Tehran, Iran. *J Gastroenterol Hepatol*. 24:1380-6.
- 33 Lima, V. P., Silva-Fernandes, I. J. L., Alves, M. K. S., Rabenhorst, S. H. B. 2011. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: An association with histopathological parameters. *Cancer Epidemiology*.
- 34 Chomvarin, C., Namwat, W., Chaicumpar, K. et al. 2008. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis*.12:30–6.
- 35 Crusius, J. B. A., Canzian, F., Capella, G. et al. 2008. Cytokine gene polymorphisms and the risk of adenocarcinoma of the stomach in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST) *Annals of Oncology*. 19:1894–1902.
- 36 Yea, S. S., Yang, Y. I., Jang, W. H. et al. 2001. Association between TNFpromoter polymorphism and *Helicobacter pylori* *cagA* subtype infection *J Clin Pathol*. 54:703–706.
- 37 Lee, J. Y., Kim, H. Y., Kim, K. H. et al. 2005. Association of polymorphism of IL-10 and TNF-A genes with gastric cancer in Korea *Cancer Letters*. 225:207–214.
- 38 Sugimoto, M., Furuta, T., Shirai, N. et al. 2007. Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta on development of peptic ulcer and gastric cancer *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 22:51–59.
- 39 Yang, J. J., Ko, K. P., Cho, L. Y. et al. 2009. The role of TNF genetic variants and the interaction with cigarette smoking for gastric cancer risk: a nested case-control study. *BMC Cancer*. 238:1-10.
- 40 Hwang, I. R., Hsu, P. I., Peterson, L. E. et al. 2003. Interleukin-6 Genetic Polymorphisms are not Related to *Helicobacter pylori*-Associated Gastroduodenal Diseases. *Helicobacter*. 8:142–148.
- 41 Kang, J. M., Kim, N., Lee, D. H. et al. 2009. The Effects of Genetic Polymorphisms of IL6, IL-8, and IL-10 on *Helicobacter pylori*-induced Gastroduodenal Diseases in Korea. *J Clin Gastroenterol*. 43:420–428.

42 Kroeger, K. M., Carville, K. S. and Abraham, L. J. 1997. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol.* 34:391-9.

43 Andres, S., Schmidt, H. M. A., Mitchell, H. et al. 2011. *Helicobacter pylori* defines local immuneresponse through interactionwith dendritic cells. *Immunol Med Microbiol.* 61:168–178

Anexo – I**Protocolo de Coleta no Centro cirúrgico**

Durante todo o procedimento utilizar máscara e luvas estéreis.

- 1- Conferir o material a ser utilizado para coleta (Identificação do pacientes, máquina fotográfica, régua, caneta para tubo, criotubo estéril e protocolo a ser preenchido);
- 2- Identificar os tubos com o número da amostra, tipo de mucosa (tumoral ou normal) e a data (Ex.: CG-01-N1/D-M-2004);
- 3- Após a retirada da peça, colocá-la em cuba estéril e lavá-la com soro fisiológico estéril (se necessário). Secá-la com compressa estéril;
- 4- colocar a peça em um campo azul estéril, em seguida a régua e a identificação logo abaixo da peça, tirar uma foto panorâmica e uma foto somente do tumor utilizando flash (total 2 fotos);
- 5- Com o auxílio de pinça e bisturi estéreis, coletar primeiramente quatro espécimes da mucosa normal (o mais distante do tumor), em seguida quatro espécimes do tumor (preferencialmente as bordas, evitando as áreas de necrose e fibrose), colocar o material colhido dentro do criotubo estéril e acondicioná-los imediatamente em recipiente com gelo;
- 6- Tirar uma foto da peça pós-coleta com flash e sem régua;
- 7- Preencher o cadastro do tecido da peça cirúrgica em duplicata e desenhar um esboço marcando os locais dos quais foram coletados, bem como as margens cirúrgicas e o tamanho do tumor;
- 8- Transportar imediatamente os tubos para armazenagem em nitrogênio líquido.

Anexo –II

Parecer do Comitê de Ética

HUWC/UFC Comitê de Ética em Pesquisa Cód CEP- 047.06.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
 FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

Protocolo nº: 047.06.09

Pesquisadora Responsável: Silvia Helena Barem Habenhorst

Departamento / Serviço:

Título do Projeto: “Polimorfismos de interleucinas e enzimas do sistema de reparo do câncer gástrico: associação com *Helicobacter pylori*”

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou na sessão do dia 07/07/09 o projeto de pesquisa: **“Polimorfismos de interleucinas e enzimas do sistema de reparo do câncer gástrico: associação com *Helicobacter pylori*”**, tendo como pesquisadora responsável Silvia Helena Barem Habenhorst.

Baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), o Comitê de Ética resolve classificar o referido projeto como: **APROVADO.**

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 07/07/10).

Fortaleza, 07 de julho de 2009.

Mônica Cardoso Façanha

Dra. Mônica Cardoso Façanha
 Coordenadora do CEP-HUWC

Anexo - III**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Instituição: DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu

Investigadora Responsável: Silvia Helena Barem Rabenhorst

Título: ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS

Eu, _____ por este meio, fui informado(a), em detalhes sobre o estudo intitulado: ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS. 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 podem levar ao desenvolvimento do carcinoma gástrico, de modo a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria denominada *H. pylori* e de um vírus denominado EBV. Esses serão detectados através da presença do material genético destes agentes infectantes no tumor. Serão também observadas as alterações genéticas das células tumorais. Estas alterações serão vistas pela expressão de proteínas, ou pela análise do DNA/RNA do tumor.

Cerca de 150 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. 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 relativo a hábitos de vida e a minha doença. 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 que poderá estar contribuindo para que se entendam melhor os fatores de risco e alterações que propiciem o aparecimento do câncer gástrico. A identificação dos fatores de risco para câncer gástrico servirá para direcionar medidas preventivas. Por outro lado as alterações dos materiais genéticos encontradas nas células tumorais poderão ser usadas como fatores que auxiliarão no diagnóstico, prognóstico e também como alvos das novas terapias que estão sendo agora desenvolvidas.

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 a minha participação, posso contactar 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: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do investigador: _____

Anexo – IV

Cadastro de Pacientes Submetidos à Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica

Código CG: _____ Data ____/____/____

Nº Prontuário _____ Data de admissão no serviço hospitalar ____/____/____

Depto Responsável _____ Hospital _____

Nome _____ Sexo F [] M []

Endereço _____

Contato _____ Naturalidade _____ Procedência _____

Idade _____ Nasc ____/____/____ Cor _____ ABO _____

Grau de instrução _____ Profissão _____

História familiar:

[] Avô [] Avó [] Mãe [] Pai [] Irmão(ã) [] Tio(a) [] Filho(a) Outros _____

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

[] Tabagista Tipo _____ Freqüência _____ Fum. passivo []

[] Álcool Tipo _____ Freqüência _____

Dados relativos à neoplasia.

Data do primeiro diagnóstico ____/____/____ Exam _____

H. pylori []

Sítio anatômico _____ Est. Clínico T ___ N___ M___

Aspecto morfológico _____ Bormann _____

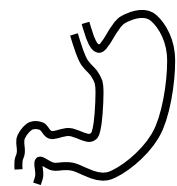
Exame anatomopatológico N°: _____**Tratamento:** [] Radioterapia [] Quimioterapia [] Hormonioterapia [] Imunoterapia

Protocolo _____

Cirurgia: realizada em ____/____/____ Cirurgião _____

Responsável pela Coleta _____

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



Observações _____

Nº de amostra Tumoral congelada [] Nº de amostra Normal []

Local Armazenamento: _____