
Artigo Original / Original Article

IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES IL1B, IL1RN E TNFA NA GASTRITE CRÔNICA ASSOCIADA À INFECÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI* E NO CARCINOMA GÁSTRICOM. R. SILVA^{1,2}, A. SAMPAIO^{2,3}, A. ALMEIDA³, S. BALSEIRO³, P. SANTOS^{2,3}, L. CARVALHO¹**Resumo**

Durante o curso da gastrite crónica, os alelos IL1B -511T, IL1RN +2018C e o haplótipo TNFA -308A/-238A estão associados ao aumento dos níveis de produção das respectivas citocinas. Os indivíduos portadores destes polimorfismos podem apresentar um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, condicionando uma inflamação severa e constante, atrofia da mucosa gástrica, hipocloridria e, por fim, desenvolvimento de carcinoma gástrico devido a alterações genéticas das células epiteliais que, na tentativa de adaptação, sofrem fenómenos de metaplasia e displasia.

Pretendeu-se verificar a presença dos polimorfismos das citocinas pró-inflamatórias IL-1B, IL-1RN e TNF- α no carcinoma gástrico e na gastrite crónica.

Os polimorfismos IL1B -511C>T, IL1RN +2018T>C e TNFA -308G>A e -208G>A foram analisados por ARMS-PCR em 47 biópsias: 36 biópsias de carcinoma gástrico, 11 biópsias de Gastrite crónica com infecção moderada por *Helicobacter pylori* e 39 amostras de sangue de indivíduos saudáveis, usando o *Cytokine Box Typing Kit* (Genebox R&D, Coimbra, Portugal).

Foi encontrada associação entre o genótipo IL1RN +2018 CC (p=0.0002) e o carcinoma gástrico, sendo o genótipo IL1RN +2018 TT (p=0.01) associado com a ausência de doença. Os genótipos IL1RN +2018 CC (p=0.01), TNFA -308 AA, alto produtor, (p=0.006) e o TNFA -238 AA, alto produtor, (p=0.0001) foram associados com a susceptibilidade à gastrite crónica, enquanto os genótipos TNFA -308 GG e TNFA -238 GG, baixos produtores, demonstraram um efeito protector.

Concluimos que os genótipos, altos produtores, do TNFA e IL1RN, têm um papel importante na manutenção da gastrite crónica e estão presentes no carcinoma gástrico, podendo o estudo dos polimorfismos destes genes ser um importante marcador para a susceptibilidade individual para o desenvolvimento do carcinoma na gastrite crónica.

Summary

In chronic gastritis the alleles IL1B -511T, IL1RN +2018C and the haplotype TNFA -308A/-238A are associated with high levels of the respective cytokine production. The referred polymorphisms may also induce a high production of pro-inflammatory cytokines leading to a constant and severe inflammatory response and subsequently, gastric mucosa atrophy, hypochloridria and finally gastric carcinoma as a consequence of genetic alterations in epithelial cells after metaplastic and dysplastic phenomena.

The presence of those polymorphisms representing the pro-inflammatory cytokines IL-1B, IL-1RN and TNF- α were analysed in cases of chronic gastritis and gastric carcinoma. The polymorphisms IL1B -511C>T, IL1RN +2018T>C and TNFA -308G>A and -208G>A were analysed by ARMS-PCR in 47 biopsies: 36 cases of gastric carcinoma, 11 cases of chronic gastritis associated with *Helicobacter pylori* were studied; 39 blood samples of healthy individuals were also analysed with the *Cytokine Box Typing Kit* (Genebox R&D, Coimbra, Portugal).

An association between the IL-1RN +2018 CC genotype and gastric carcinoma was observed (p=0.0002), while the genotype IL-1RN +2018 TT (p=0.01) was associated with disease absence. The genotypes IL-1RN +2018 CC (p=0.01), TNFA -308 AA (p=0.05) and TNFA -238 AA (p=0.0001) were demonstrated in cases of chronic gastritis and the TNFA -308 GG and TNFA -238 GG genotypes, low producers, were associated with gastritis resistance.

In this study TNFA and IL1RN polymorphisms were associated with chronic gastritis due to *Helicobacter pylori* infection and were also present in patients with gastric carcinoma. Therefore, if these results are confirmed those polymorphisms may be used as a biological marker of individual susceptibility in the development of gastric carcinoma in chronic gastritis.

GE - J Port Gastrenterol 2008; 15: 8-14

(1) Instituto de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

(2) Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Portugal.

(3) GeneBox R&D, Coimbra, Portugal.

Recebido para publicação: 10/10/2007

Aceite para publicação: 22/01/2008

INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico (CG) é uma das neoplasias mais comuns em todo o mundo e a segunda causa de morte relacionada com o cancro ^(1,2). O seu diagnóstico é geralmente feito numa fase avançada da doença, o que dificulta a eficácia dos procedimentos terapêuticos e o prognóstico dos pacientes ⁽²⁾. Os estudos actuais centram-se na identificação de factores que contribuam para o conhecimento da biopatologia e risco para a doença ⁽³⁾.

A bactéria *Helicobacter pylori* (HP) tem um papel específico no desenvolvimento do CG e é classificada, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), como um carcinogénico do tipo I ⁽¹⁾. Esta bactéria é um importante agente patogénico porque coloniza as células epiteliais da mucosa gástrica e do duodeno em cerca de 50% da população mundial ⁽¹⁾. Em Portugal a prevalência ronda os 80% em adultos assintomáticos ⁽⁴⁾.

A inflamação local na infecção por HP é caracterizada pela infiltração de neutrófilos e linfócitos específicos na mucosa gástrica. A bactéria, ao colonizar a mucosa gástrica, suscita a resposta inflamatória e imune, levando ao aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 ^(5,6).

Os polimorfismos nos genes da IL-1 e do TNF- α foram associados a maior risco de carcinoma gástrico em doentes infectados por HP ^(4,7-9). A variação inter-individual na expressão destas citocinas na inflamação gástrica é explicada em grande parte por estes polimorfismos ⁽¹⁰⁾ fazendo parte do fundo genético predisponente para carcinoma em pacientes com infecção por HP ⁽⁴⁾.

A *Helicobacter pylori* aumenta a produção de IL-1 β , importante citocina pró-inflamatória e um potente inibidor da secreção de ácido gástrico, tendo um papel *major* na iniciação e amplificação da resposta inflamatória ^(7,10,11). O promotor do gene da IL-1 β contém várias regiões polimórficas que afectam a expressão da proteína ^(12,13). O alelo IL1B -511T, associado ao aumento de produção da IL-1 β , tem sido referido como factor de risco de cancro quando a infecção por HP está presente ^(13,14).

O antagonista do receptor da IL-1 (IL-1RN) é uma citocina anti-inflamatória que compete com a IL-1 β para a ligação ao receptor da IL-1, modelando desta forma os potenciais danos desta citocina ^(7,10,11,15). Os polimorfismos do gene IL1RN, nomeadamente da posição +2018 T>C, afectam significativamente a produção de IL-1 β pela mucosa gástrica em resposta à infecção por HP e o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas ⁽¹⁶⁾.

O TNF- α , tal como a IL-1 β , é uma citocina pró-inflamatória e um inibidor da secreção de ácido gástrico, tendo um papel importante no processo infeccioso e por conseguinte, na gastrite induzida por HP ^(4,8,17). Vários polimorfismos bi-alelicos no gene que codifica esta cito-

cina são conhecidos, incluindo o TNFA -308 G>A e o TNFA -238 G>A. O haplótipo TNFA -308/-238 A/A está associado a um aumento da produção de TNF- α o que confere um risco acrescido de desenvolver CG ^(12,17).

Neste contexto, analisou-se a frequência dos polimorfismos da região promotora do gene TNFA (-308 G>A e -238 G>A) e IL1B (-511C>T), bem como o polimorfismo da região codificante IL1RN +2018 T>C em biopsias de carcinoma gástrico e de gastrite crónica com a presença do *Helicobacter pylori*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas 36 amostras de carcinoma gástrico e 11 amostras de gastrite crónica (GC) para a pesquisa dos polimorfismos definidos. As biopsias gástricas sofreram o processamento habitual da fixação em formol e inclusão em parafina e foram seleccionadas nos arquivos do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A aplicação da técnica de Giemsa modificado permitiu observar a colonização pelo *H. pylori* em biopsias com gastrite crónica com actividade moderada e severa.

As biopsias de gastrite crónica correspondiam a 3 indivíduos do sexo masculino e 8 indivíduos do sexo feminino com uma média de idades de 53,5 anos. As biopsias de carcinoma gástrico correspondiam a 21 indivíduos do sexo masculino e 15 indivíduos do sexo feminino com uma média de idades de 61,7 anos tendo sido aplicada a classificação histológica de Laurén: carcinoma gástrico do tipo difuso (n=13), carcinoma gástrico do tipo intestinal (n=16) e carcinoma gástrico do tipo indeterminado (n=7). Como grupo controlo foram utilizadas 39 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, escolhidas aleatoriamente: 22 eram do Banco de Material Biológico da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e 17 correspondiam ao Painel de DNA Controlo da Genobox R&D, Coimbra.

Extracção de DNA

Foram utilizados 2 métodos de extracção de DNA a partir das biopsias gástricas incluídas em parafina.

Assim, de acordo com o protocolo de extracção do *QIA-amp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) para tecido em parafina, efectuaram-se 5 a 8 cortes de 10 mm de espessura de cada amostra, adicionando-se posteriormente xilol para remoção da parafina. Após centrifugação, as amostras foram lavadas com etanol a 96-100%. Seguidamente, foi realizada a lise da parede bacteriana

pela Proteinase K, durante um dia e purificação do DNA obtido através de colunas.

Por outro lado, de acordo com o protocolo de extracção de DNA de tecido em lâmina, procedeu-se ao corte de 4 secções de 10 mm de espessura cada, colocando-as nas respectivas lâminas, deixadas na estufa a 37°C de um dia para o outro. Cada lâmina foi posteriormente lavada com xilol seguindo-se várias lavagens com álcool a diferentes graus. Após microdissecção manual do tecido contido na lâmina, incubou-se o material a 55°C, com a seguinte mistura: 50mM Tris HCl, 1mM EDTA, 1% Tween 20 e 3mg/ml Proteinase K (Roche; Mannheim, Alemanha). Finalmente, colocaram-se os tubos a 100°C durante 10 minutos, para inactivação da proteinase K, seguindo-se a colocação em gelo durante 10 minutos.

Por sua vez, o DNA das amostras controlo de sangue colhido para EDTA, foi extraído de acordo com o protocolo do *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) para sangue periférico e guardado a 4°C.

Por fim, procedeu-se à determinação da pureza e concentração do DNA de todas as amostras, por espectrofotometria a um comprimento de onda de 260/280 nm, utilizando o aparelho *GeneQuant pro* (Biochrom, Cambridge, Inglaterra).

Genotipagem ARMS-PCR

Os polimorfismos IL1B -511 C>T, IL1RN +2018 T>C, TNFA -308 G>A e -238 G>A foram genotipados por ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System – Polymerase Chain Reaction*). Os *primers* utilizados foram desenhados a partir da sequência dos genes pretendidos com o auxílio do programa *Primer Express*.

Em cada poço da placa de tipagem (96 poços) do *Cytokine Box Typing Kit* (Genebox R&D, Coimbra, Portugal), foram colocados 0.8 µl de DNA (100-200 ng/µl) de cada amostra e 3 µl da mistura de reacção fornecida com o Kit. As placas de tipagem foram seladas e colocadas num termociclador *MyCycler Personal* (BioRad, Califórnia, EUA) de 96 poços, com o seguinte programa: 1 ciclo a 96°C/1 minuto; 5 ciclos de 96°C/25 segundos,

70°C/45 segundos e 72°C/30 segundos; 21 ciclos de 96°C/25 segundos, 65°C/45 segundos e 72°C/30 segundos; 4 ciclos a 96°C/25 segundos, 55°C /1 minuto e 72°C/2 minutos; por fim 1 ciclo a 72°C/10 minutos.

No final os produtos da PCR foram detectados por electroforese em gel de agarose a 2%, com *Sybr Safe* (Invitrogen, Oregon, EUA).

Análise Estatística

Foi efectuado o cálculo das frequências de cada polimorfismo nas amostras em estudo e analisou-se o valor de *p* pelo teste exacto de Fisher e χ^2 , usando o programa STATISTICA 5.1 (*StatSoft*, Tulsa, EUA), tendo-se considerado um valor de *p*<0.05 como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Neste estudo foram incluídas 36 biópsias de carcinoma gástrico, 11 biópsias de gastrite crónica e 39 amostras controlo para determinação dos polimorfismos IL1B -511 C>T, IL1RN +2018 T>C, TNFA -308 G>A e -238 G>A.

Polimorfismo IL1B -511C>T

Relativamente ao polimorfismo na posição -511 no gene da Interleucina-1β verificou-se que o alelo C é o mais frequente nos três grupos estudados. No entanto, é no grupo com gastrite crónica que a desigualdade de frequências entre os alelos C e T é mais evidente, obtendo-se desta forma diferenças significativas entre os indivíduos com gastrite crónica e os indivíduos com carcinoma gástrico (*p*=0.04). Comparando os indivíduos com gastrite crónica e os controlos verifica-se a existência de diferenças consideráveis entre os dois grupos embora não sendo significativas (*p*=0.08) (Quadro I).

Em relação aos genótipos IL1B, no grupo controlo o genótipo mais frequente é o heterozigótico (CT) enquan-

Quadro I - Frequência alélica e genotípica do polimorfismos IL1B -511 C>T em doentes com carcinoma gástrico, gastrite crónica e controlos.

	Controlos (CT)		Carcinoma Gástrico (CG)		Gastrite Crónica (GC)		P (CG vs CT)	P (GC vs CT)	P (CG vs GC)
	N	Freq	N	Freq	N	Freq			
IL1B -511									
Alelo									
C	48	0.62	42	0.58	18	0.82	n.s	0.08	0.04
T	30	0.38	30	0.42	4	0.18	n.s	0.08	0.04
Genótipo									
CC	14	0.36	15	0.42	7	0.64	n.s	0.1	n.s
CT	20	0.51	12	0.33	4	0.36	n.s	n.s	n.s
TT	5	0.13	9	0.25	0	0	n.s	n.s	0.07

Quadro II - Frequência alélica e genotípica do polimorfismo IL1RN +2018 T>C em doentes com carcinoma gástrico, gastrite crônica e controles.

IL1RN +2018	Controlos (CT)		Carcinoma Gástrico (CG)		Gastrite Crônica (GC)		p (CG vs CT)	p (GC vs CT)	p (CG vs GC)
	N	Freq	N	Freq	N	Freq			
Alelo									
C	12	0.15	35	0.49	11	0.50	0.00001	0.0008	n.s
T	66	0.85	37	0.51	11	0.50	0.00001	0.0008	n.s
Genótipo									
CC	1	0.03	14	0.39	3	0.27	0.0002	0.01	n.s
TC	10	0.27	7	0.19	5	0.46	n.s	n.s	0.07
TT	28	0.72	15	0.42	3	0.27	0.01	0.01	n.s

to o genótipo CC é o mais prevalente nos restantes grupos. Confrontando o grupo da gastrite crônica com o grupo do carcinoma gástrico evidencia-se a diferença nas frequências do genótipo TT (0% vs 25%), embora não sendo significativa ($p=0.07$) (Quadro I).

Polimorfismo IL1RN +2018 T>C

Comparando os três grupos estudados relativamente às frequências alélicas do polimorfismo IL1RN +2018 T>C, observa-se que na população controlo o alelo T é mais frequente, enquanto que nos demais grupos não existe prevalência de nenhum alelo. Estas diferenças entre as distribuições alélicas dos controlos *versus* indivíduos com alterações gástricas são estatisticamente muito significativas ($p<0.001$) (Quadro II).

Comparando os três grupos em relação à distribuição do genótipo IL1RN +2018 CC, verifica-se que este se encontra aumentado tanto nos indivíduos com gastrite crônica ($p=0.01$) como nos indivíduos com carcinoma gástrico ($p=0.0002$). Por outro lado, o genótipo TT encontra-se diminuído nos indivíduos com alterações gástricas comparativamente ao grupo controlo ($p=0.01$) (Quadro II).

Polimorfismos TNFA -308 G>A e TNFA -238 G>A

O alelo TNFA -308G é o mais frequentemente encontrado tanto na população com cancro como na população controlo. Na população com gastrite ocorre o inverso,

sendo o alelo A o mais frequente neste grupo. Estas diferenças na distribuição alélica entre o grupo com gastrite e os restantes grupos são bastante significativas ($p\leq 0.0007$) (Quadro III).

No que se refere à frequência genotípica TNFA -308 G>A, apenas se verificam diferenças entre o grupo com gastrite crônica e os restantes grupos. Nos indivíduos com gastrite crônica o genótipo AA (73%) é o mais prevalente enquanto nos restantes grupos é o genótipo GG o mais frequente (61% e 64%). Foram encontradas diferenças com significado estatístico ao comparar o grupo da gastrite crônica com os demais grupos relativamente à distribuição do genótipo GG ($p\leq 0.05$), e diferenças bastante significativas relativamente à distribuição do genótipo AA ($p\leq 0.006$) (Quadro III).

Para o TNFA -238 G>A, as frequências alélicas são em grande parte semelhantes à posição -308, em que o alelo G é mais frequente na população controlo (82%) e na população com cancro (81%), enquanto que na população com gastrite o alelo A é o mais frequente (82%). Estas diferenças alélicas entre o grupo com gastrite crônica e os restantes grupos são bastante significativas ($p=0.00001$) (Quadro IV).

Relativamente à frequência genotípica TNFA -238 G>A, no grupo controlo e no grupo com cancro o genótipo GG é o mais frequente, enquanto que o genótipo AA é o menos prevalente. No grupo com gastrite verifica-se o inverso, o genótipo AA é o mais prevalente (73%) e o genótipo GG o menos prevalente (9%). A dis-

Quadro III - Frequência alélica e genotípica do polimorfismo TNFA -308 G>A em doentes com carcinoma gástrico, gastrite crônica e controles.

TNFA -308	Controlos (CT)		Carcinoma Gástrico (CG)		Gastrite Crônica (GC)		p (CG vs CT)	p (GC vs CT)	p (CG vs GC)
	N	Freq	N	Freq	N	Freq			
Alelo									
G	58	0.74	50	0.69	6	0.27	n.s	0.0001	0.0007
A	20	0.26	22	0.31	16	0.73	n.s	0.0001	0.0007
Genótipo									
GG	24	0.61	23	0.64	3	0.27	n.s	0.05	0.04
GA	10	0.26	4	0.11	0	0	n.s	n.s	n.s
AA	5	0.13	9	0.25	8	0.73	n.s	0.0002	0.006

Quadro IV - Frequência alélica e genotípica do polimorfismo TNFA -238 G>A em doentes com carcinoma gástrico, gastrite crónica e controlos.

TNFA -238	Controlos (CT)		Carcinoma Gástrico (CG)		Gastrite Crónica (GC)		p (CG vs CT)	p (GC vs CT)	p (CG vs GC)
	N	Freq	N	Freq	N	Freq			
Alelo									
G	64	0.82	54	0.81	4	0.18	n.s	0.00001	0.00001
A	14	0.18	14	0.19	18	0.82	n.s	0.00001	0.00001
Genótipo									
GG	29	0.75	25	0.69	1	0.09	n.s	0.0003	0.001
GA	6	0.15	8	0.23	2	0.18	n.s	n.s	n.s
AA	4	0.10	3	0.08	8	0.73	n.s	0.0001	0.00001

tribuição dos genótipos GG e AA apresentam diferenças muito significativas quando comparamos o grupo da gastrite crónica com os restantes grupos ($p \leq 0.001$) (Quadro IV).

Comparando o haplótipo TNFA -308/-238 nos três grupos analisados, obtiveram-se diferenças significativas no haplótipo GG-GG ($p=0.04$) e muito significativas no haplótipo AA-AA ($p=0.00001$), entre o grupo de indivíduos com gastrite e os demais grupos. Verificando-se que o haplótipo GG-GG tem uma maior prevalência no grupo controlo (45%) e no grupo com carcinoma (44%), enquanto o grupo com gastrite tem uma maior prevalência do haplótipo AA-AA (72%) (Quadro V).

DISCUSSÃO

Um dos factores etiológicos associados com o desenvolvimento de gastrite crónica e de carcinoma gástrico é a infecção por *Helicobacter pylori*. No entanto, existe uma diferença significativa entre o número de pessoas infectadas por *HP* e o desenvolvimento destas doenças. Tem sido demonstrado que polimorfismos existentes em genes envolvidos na regulação da resposta inflamatória, tais como os presentes nos genes IL1B, IL1RN e TNFA,

aumentam o risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico. Estas citocinas estão implicadas na patogénese de muitas doenças inflamatórias crónicas e têm um papel substancial na regulação da resposta imune e inflamatória das perturbações gástricas.

Carcinoma Gástrico versus Controlo

Neste estudo verificou-se que na população com carcinoma gástrico apenas os polimorfismos do gene IL1RN apresentaram diferenças significativas. Estes resultados sugerem que a presença do alelo IL1RN +2018C e do genótipo CC aumentam o risco de desenvolvimento do carcinoma gástrico, enquanto o alelo T e o genótipo TT parecem ter um efeito protector. Embora não existam estudos sobre este polimorfismo na doença gástrica, noutra tipo doenças a presença do alelo mutado (alelo C) parece ser responsável por um aumento da produção de IL-1 β , devido a diminuição de IL-1ra e consequentemente aumento no rácio IL-1 β /IL-1ra⁽¹⁸⁾. O aumento da IL-1 β potencia tanto a resposta inflamatória crónica à infecção do *HP* e como risco de carcinoma gástrico, possivelmente pela alteração dos níveis de IL-1 β no estômago. Este aumento favorece a iniciação de um conjunto de respostas ao *HP* o que resulta em hipocloridria, atrofia do corpo do estômago e aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico⁽¹⁹⁾.

Quadro V - Frequência dos haplogenótipos TNFA -308/-238 em doentes com carcinoma gástrico, gastrite crónica e controlos.

Haplo genótipo (-308/-238)	Controlos (CT)		Carcinoma Gástrico (CG)		Gastrite Crónica (GC)		p (CG vs CT)	p (GC vs CT)	p (CG vs GC)
	N	Freq	N	Freq	N	Freq			
GG-GG	17	0.45	16	0.44	1	0.09	n.s	0.04	0.04
GG-AG	3	0.08	2	0.05	0	0	n.s	n.s	n.s
GG-GA	4	0.10	6	0.16	2	0.19	n.s	n.s	n.s
GG-AA	0	0	1	0.02	0	0	n.s	n.s	n.s
AG-AG	9	0.23	7	0.19	0	0	n.s	n.s	n.s
AG-GA	2	0.05	1	0.02	0	0	n.s	n.s	n.s
AG-AA	0	0	0	0	0	0	n.s	n.s	n.s
GA-GA	3	0.07	1	0.02	0	0	n.s	n.s	n.s
GA-AA	0	0	0	0	0	0	n.s	n.s	n.s
AA-AA	1	0.02	2	0.05	8	0.72	n.s	0.00001	0.00001

Gastrite Crónica versus Controlo

Na população com gastrite foram encontradas diferenças significativas em todos os polimorfismos estudados, sendo estes polimorfismos associados com a um risco acrescido ou uma diminuição da incidência de gastrite crónica. A presença dos polimorfismos IL1B -511C, IL1RN +2018C, TNFA -308A e -238A parecem ter um papel importante na infecção por *HP* e no aumento da susceptibilidade para a gastrite crónica. Os resultados obtidos na comparação entre controlos e gastrite crónica para IL1B parecem contrariar estudos anteriormente realizados em Portugal e noutras populações caucasianas que associam o alelo IL1B -511T a um risco aumentado de gastrite crónica atrofica ^(7,11).

Tal como no carcinoma gástrico, a presença do alelo IL1RN +2018C e do genótipo CC aumentam o risco de desenvolvimento de gastrite crónica, enquanto o alelo T e o genótipo TT parecem ter um efeito protector. O estudo de Carter *et al* (2001) sobre polimorfismos IL1RN na colite ulcerosa em caucasianos do norte da europa corrobora os nossos resultados e permite uma associação com outros estudos ⁽²⁰⁾. Sendo a IL-1 β , uma importante citocina pró-inflamatória, possui um papel *major* na iniciação, amplificação da resposta inflamatória e um potente inibidor da secreção de ácido gástrico e está intimamente associada à severidade da inflamação gástrica ^(7,11,13).

Relativamente aos polimorfismos TNFA -308 G>A e -238 G>A o presente estudo parece relacioná-los com desenvolvimento da gastrite crónica, embora noutros estudos não seja evidente esta associação. Estando o haplogenótipo TNFA -308/-238 AA-AA associado a um risco acrescido de desenvolvimento da gastrite crónica, bem como os alelos A e genótipos AA para ambas as mutações estudadas, enquanto o haplogenótipo GG-GG parece ter um efeito protector, do mesmo modo que os alelos G e genótipos GG. A mutação G>A é responsável pelo aumento de produção desta citocina. Sendo o TNF- α uma citocina pró-inflamatória, responsável por uma resposta rápida do hospedeiro contra a infecção e pela amplificação da resposta inflamatória e inibição da secreção de ácido gástrico, poderá estar associado à severidade da inflamação gástrica e consequentemente ao desenvolvimento da gastrite crónica ^(1,11-13).

Carcinoma Gástrico versus Gastrite Crónica

Na população com gastrite foram encontradas diferenças significativas nos polimorfismos IL1B -511C, TNFA -308A e -238A, estando estes polimorfismos associados a um risco acrescido de desenvolvimento da gastrite crónica e a uma diminuição da incidência do carcinoma gástrico.

Os resultados obtidos na comparação entre carcinoma gástrico e gastrite crónica para IL1B parecem associar a presença do alelo -511C e do genótipo -511CC ao desenvolvimento da gastrite e à protecção contra o aparecimento do carcinoma gástrico. Por outro lado, a presença do alelo -511T e do genótipo TT parece associar-se ao desenvolvimento do carcinoma gástrico e à protecção do aparecimento de gastrite crónica. Estes dados são corroborados por Figueiredo *et al* (2002) que descreve que o polimorfismo -511T está associado ao risco de desenvolvimento de carcinoma ⁽⁹⁾.

Relativamente aos polimorfismos TNFA -308 G>A e -238 G>A, o presente estudo parece relacioná-los com desenvolvimento da gastrite crónica e do carcinoma gástrico. Assim, o haplogenótipo TNFA -308/-238 AA-AA foi associado a um risco acrescido de desenvolvimento da gastrite crónica e a um risco diminuído de desenvolvimento do carcinoma gástrico, bem como os alelos A e genótipos AA para as duas mutações. Por outro lado, o haplogenótipo GG-GG parece ter um efeito protector para a gastrite e parece ser um factor de risco para o desenvolvimento do cancro gástrico, bem como os alelos G e genótipos GG. Estes dados vêm contrariar o anteriormente descrito em relação ao carcinoma gástrico, o que poderá atribuir-se à dimensão dos grupos estudados ou à influência de outros factores não considerados. É importante não esquecer que, não são apenas os factores do hospedeiro na infecção com *HP* que condicionam o risco de gastrite crónica e de carcinoma gástrico, isto é, não são apenas os polimorfismos de citocinas mas também factores como a virulência desta bactéria que devem ser tidos em consideração ⁽²¹⁾. Genes como o *vacA* e *cagA* condicionam significativamente a evolução para gastrite e para carcinoma gástrico, tal como demonstrado por Figueiredo *et al*. (2002) ⁽¹¹⁾. Os factores ambientais, essencialmente relacionados com a dieta, também têm uma importância fulcral neste processo. Acredita-se que os métodos de conservação da comida têm impacto na incidência de carcinoma gástrico. Principalmente, quando se usa o fumo como forma de conservação dos alimentos ⁽¹⁴⁾. Para uma melhor compreensão dos factores de risco para o desenvolvimento de carcinoma gástrico e susceptibilidade para a gastrite crónica, seria interessante em trabalhos posteriores estudar um painel mais alargado de polimorfismos não só de citocinas pró-inflamatórias, mas também de citocinas anti-inflamatórias e, se possível, num maior número de amostras. A forma como os polimorfismos afectam a produção destas citocinas deverá ser tida em conta, comparando os polimorfismos com a expressão génica das respectivas citocinas. Seria também interessante estudar os factores de patogenidade do *HP* que, uma vez associados aos diferentes polimorfismos, podem condicionar a severidade da doença.

CONCLUSÃO

Este estudo sugere que existe associação entre os polimorfismos das citocinas estudadas e a prevalência de gastrites crônicas na população portuguesa. Em relação, ao carcinoma gástrico apenas os polimorfismos dos genes IL1RN e da IL1B parecem estar associados com o risco de desenvolvimento desta patologia, enquanto o polimorfismo do TNFA parece estar associado a um efeito protector.

Por conseguinte, a possibilidade de determinação de riscos individuais de desenvolvimento de carcinoma gástrico e de gastrites crônicas pode constituir uma ferramenta importante para a prevenção destas doenças, o que assume uma particular importância em países, como Portugal, com uma taxa de infecção de *H. pylori* elevada, uma vez que permitiria direccionar intervenções com objectivos preventivos, principalmente para indivíduos com um risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma gástrico.

Correspondência:

Prof. Doutora Lina Carvalho
 Instituto de Anatomia Patológica
 Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
 3004-504 Coimbra
 Tel.: (+351) 239 857 700
 Fax: (+351) 239 857 749
 e-mail: lcarvalho@huc.min-saude-pt

BIBLIOGRAFIA

- Robertson MS, Clancy RL, Cade JF. Helicobacter pylori in intensive care: why we should be interested. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 1881-8.
- Ito M, Tanaka S, Kamada T, Haruma K, Chayama K. Causal role of Helicobacter pylori infection and eradication therapy in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 10-6.
- Hu S, Song QB, Yao PF, Hu QL, Hu PJ, Zeng ZR, et al. No relationship between IL-1B gene polymorphism and gastric acid secretion in younger healthy volunteers. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 6549-53.
- Kikuchi S. Epidemiology of Helicobacter pylori and gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2002; 5: 6-15.
- Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, Fujiki H. Carcinogenic role of tumor necrosis factor-alpha inducing protein of Helicobacter pylori in human stomach. *J Biochem Mol Biol.* 2006; 39: 1-8.
- Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during Helicobacter pylori infection. *Gut.* 2004; 53: 1082-9.
- Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology.* 2003; 125: 364-71.
- Perez-Perez GI, Garza-Gonzalez E, Portal C, Olivares AZ. Role of cytokine polymorphisms in the risk of distal gastric cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1869-73.
- Ruzzo A, Graziano F, Pizzagalli F, Santini D, Battistelli V, Panunzi S, et al. Interleukin 1B gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms in Helicobacter pylori-negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype. *Ann Oncol.* 2005; 16: 887-92.
- Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, et al. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer.* 2005; 114: 237-41.
- Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 1680-7.
- El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 2003; 124: 1193-201.
- Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, et al. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology.* 2001; 121: 823-9.
- Mégraud F, Lehours P. Helicobacter pylori and gastric cancer prevention is possible. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28: 392-8.
- Sehouli J, Mustea A, Koensgen D, Chen FC, Lichtenegger W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with increased risk of epithelial ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2003; 14: 1501-4.
- Balasubramanian SP, Azmy IA, Higham SE, Wilson AG, Cross SS, Cox A, et al. Interleukin gene polymorphisms and breast cancer: a case control study and systematic literature review. *BMC Cancer.* 2006; 6: 188.
- Yea SS, Yang YI, Jang WH, Lee YJ, Bae HS, Paik KH. Association between TNF-alpha promoter polymorphism and Helicobacter pylori cagA subtype infection. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 703-6.
- Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, Pang RP, Chen MH, Ng M, et al. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut.* 2003; 52: 1684-9.
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 2000; 404: 398-402.
- Carter MJ, di Giovine FS, Jones S, Mee J, Camp NJ, Lobo AJ, et al. Association of the interleukin 1 receptor antagonist gene with ulcerative colitis in Northern European Caucasians. *Gut.* 2001; 48: 461-7.
- Dhar SK, Soni RK, Das BK, Mukhopadhyay G. Molecular mechanism of action of major Helicobacter pylori virulence factors. *Mol Cell Biochem.* 2003; 253: 207-15.