

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Maria da Cunha Sampaio

Influência dos polimorfismos genéticos da IL-4,
IL-6, IL-10 e TGF- β no Carcinoma Gástrico

Tese de Mestrado
Escola de Ciências

Trabalho efectuado sob a orientação da:
Professora Doutora Lina Carvalho

e co-orientação da:
Doutora Paula Sampaio

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Maria da Cunha Sampaio

Endereço electrónico: ana.s@portugalmail.com

Número de cartão de cidadão: 12549013

Título da tese:

Influência dos polimorfismos genéticos da IL-4, IL-6, IL-10 e TGF- β no carcinoma gástrico

Orientadora:

Professora Doutora Lina Carvalho

Co-orientadora:

Doutora Paula Sampaio

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado:

Mestrado em Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, __/__/____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, as pessoas que mais admiro e amo, sempre me ensinaram que sem um pouco de amor, esforço, dedicação e trabalho nada era possível, e que mesmo parecendo que não, o tempo chega sempre para tudo, basta querer e acreditar.

Às minhas irmãs, cunhado e sobrinha, a minha família mais chegada, os meus alicerces.

Ao meu namorado, por todas as boleias para a Universidade, pela sua compreensão e amor.

À memória da minha querida avó, pelo exemplo de força, coragem e sobretudo pela sua alegria de viver. Foi a motivação deste estudo, a razão das minhas investigações no carcinoma gástrico e no que nos torna tão susceptíveis a ele.

Às minhas ex-colegas de trabalho da Genebox, com elas aprendi muito sobre biologia molecular e investigação. Agradeço particularmente à minha amiga Sandra Balseiro pela sua disponibilidade para me ajudar, tirar todas as minhas dúvidas e principalmente pela sua amizade e paciência.

A todos os meus colegas de trabalho do Centro Regional do Sangue de Coimbra, sem a sua compreensão, solidariedade e algum esforço não conseguiria as folgas necessárias para assistir à parte curricular do Mestrado. Sem eles nada disto teria sido possível.

Ao Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, principalmente à sua Directora, Professora Doutora Lina Carvalho, à Dr.^a Maria Reis, à Dr.^a Ana Alarcão e ao Dr. Domingos Oliveira que me receberam de braços abertos e me disponibilizaram todo o material e conhecimentos necessários para a realização desta tese de mestrado.

À Doutora Paula Sampaio, pela sua enorme simpatia, pelo seu sorriso permanente e por todas as suas sugestões.

A todos Muito Obrigado!

Trabalho financiado por CIMAGO (Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncologia), Projecto nº 18/09:



INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DA IL-4, IL-6, IL-10 E TGF- β NO CARCINOMA GÁSTRICO

Múltiplos estudos sugerem a existência de uma forte associação entre inflamação e cancro, onde a expressão alterada de citocinas pró/anti-inflamatórias tem um papel crucial na promoção de diferentes tipos de tumores, incluindo o carcinoma gástrico. Diferenças na produção de citocinas entre indivíduos é muitas vezes causada por polimorfismos nos promotores ou nas sequências codificantes dos respectivos genes. A pesquisa deste tipo de marcadores genéticos no carcinoma gástrico é de extrema importância, uma vez que podem ter influência no diagnóstico, prognóstico e terapêutica da doença. Nesta perspectiva, o objectivo deste estudo consistiu em verificar a influência dos polimorfismos mais comuns dos genes envolvidos na inflamação, nomeadamente das citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TGF- β , no desenvolvimento de carcinoma gástrico e correlacionar as variações genéticas destes genes com a prevalência da doença.

Os polimorfismos IL-4 -1098 T> G, IL-4 -590 C> T, IL-4 -33 C> T, IL-6 nt565 G> A, IL-6 -174 C> G, IL-10 -1082 G> A, IL1-0 -819 C> T, IL-10 -592 C> A, TGF- β cod10 T> C e TGF- β cod25 G> C foram analisados por PCR-SSP em 100 biopsias de carcinoma gástrico de dois tipos histológicos distintos e 50 biopsias de gastrite crónica.

Os resultados deste estudo demonstraram que os polimorfismos da IL-4 e IL-6, associados a uma elevada produção destas citocinas, parecem ter um efeito protector individual no carcinoma gástrico, enquanto que a baixa produção destas IL parece aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento da carcinogénese gástrica. Contrariamente, os polimorfismos de alta expressão/actividade da IL-10 e do TGF- β aparecem associados com a maior susceptibilidade para o carcinoma gástrico e os polimorfismos de baixa expressão/actividade com a protecção para a doença.

Estes polimorfismos genéticos, directamente ligados aos níveis de expressão das respectivas citocinas, parecem influenciar a progressão do mecanismo tumoral, representando desta forma, importantes marcadores da susceptibilidade individual para o desenvolvimento de carcinoma gástrico.

ABSTRACT

INFLUENCE OF IL-4, IL-6, IL-10 AND TGF- β GENETIC POLYMORPHISMS IN GASTRIC CANCER

Multiple studies suggest the existence of a strong association between inflammation and cancer, where the altered expression of pro/anti-inflammatory cytokines has a crucial role in promoting different types of tumors including gastric cancer. Differences in cytokine production between individuals are often caused by polymorphisms in the promoter or coding sequences of cytokine genes. The research of this type of genetic markers in gastric cancer is extremely important since it may influence the diagnosis, prognosis and treatment of disease. In this perspective, the objective of this study was to investigate the influence of common polymorphisms of genes involved in inflammation, including IL-4, IL-6, IL-10 and TGF- β cytokines, in the development of gastric cancer and to correlate genetic variation these genes with disease prevalence.

The polymorphisms IL-4 -1098 T> G, IL-4 -590 C> T, IL-4 -33 C> T, IL-6 nt565 G> A, IL-6 -174 C> G, IL-10 -1082 G> A, IL1-0 -819 C> T, IL-10 -592 C> A, TGF- β cod10 T> C and TGF- β cod25 G> C were analysed by PCR-SSP in 100 cases of gastric cancer in two different histological types and 50 cases of chronic gastritis.

The results showed that the polymorphisms of IL-4 and IL-6, associated with an increased production of these cytokines, seem to have a protective effect in individual gastric cancer, while the low production of these interleukins appear to increase susceptibility to the development of gastric carcinogenesis. In contrast, polymorphisms of high expression/activity of IL-10 and TGF-B appear associated with increased susceptibility to the gastric cancer and the polymorphisms of low expression/activity with protection for the disease.

These genetic polymorphisms, directly linked to the expression levels of their cytokines, seem to influence the mechanism of tumor progression, representing important markers of individual susceptibility to the development of gastric cancer.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE QUADROS	XIV
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIV
I. INTRODUÇÃO	15
1.1. Epidemiologia.....	15
1.2. Classificação histológica	16
1.3. Factores de risco	17
1.3.1. Factores ambientais	18
1.3.1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.3.2. Factores genéticos.....	19
1.3.2.1. Caracterização de Citocinas	20
1.3.2.2. Classificação de Citocinas.....	21
1.3.2.3. Interleucina-4.....	21
1.3.2.4. Interleucina-6.....	22
1.3.2.5. Interleucina-10.....	23
1.3.2.6. <i>Transforming Growth Factor-β</i>	24
1.3.2.7. Polimorfismos genéticos em citocinas	25
1.3.2.8. Polimorfismos de citocinas e carcinoma gástrico	27
1.4. Objectivos.....	30
II. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. População	31
2.1.1. População com carcinoma	31
2.1.2. População com gastrite	31
2.2. Análise dos polimorfismos	32
2.2.1. Extracção de DNA.....	32
2.2.2. Análise de Pureza e Quantificação do DNA Extraído.....	33

2.2.3. Tipagem Genética	33
2.2.3.1. Amplificação por <i>Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers</i> (PCR-SSP)	33
2.2.4. Electroforese em Gel de Agarose	34
2.3. Análise Estatística	34
2.3.1. Frequências Alélicas e Genotípicas dos Polimorfismos Estudados	34
III. RESULTADOS	35
3.1. Pureza e Concentração das Amostras Biológicas	35
3.2. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados no Carcinoma gástrico intestinal <i>versus</i> Gastrite Crônica	36
3.3. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados no Carcinoma Gástrico Difuso <i>versus</i> Gastrite crônica	42
IV. DISCUSSÃO	49
4.1. Qualidade das Amostras Biológicas	49
4.2. Polimorfismos de Citocinas e Carcinoma Gástrico	49
4.2.1. InterLeucina-4 e Carcinoma Gástrico	50
4.2.1.1. Interleucina-4 e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal	50
4.2.1.2. Interleucina-4 e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso	51
4.2.2. Interleucina-6 e Carcinoma Gástrico	51
4.2.2.1. Interleucina-6 e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal	52
4.2.2.2. Interleucina-6 e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso	52
4.2.3. Interleucina-10 e Carcinoma Gástrico	53
4.2.3.1. Interleucina -10 e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal	53
4.2.3.2. Interleucina-10 e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso	54
4.2.4. <i>Transforming Growth Factor-β</i> e Carcinoma Gástrico	54
4.2.4.1. <i>Transforming Growth Factor-β</i> e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal	55
4.2.4.2. <i>Transforming Growth Factor-β</i> e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso	55
V. CONCLUSÃO	57
VI. BIBLIOGRAFIA	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CG	Carcinoma Gástrico
CGD	Carcinoma Gástrico do tipo Difuso
CGI	Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal
cod	codão
GCA	Gastrite Crónica Atrófica
GCNA	Gastrite Crónica Não Atrófica
HP	<i>Helicobacter Pylori</i>
IAP - FMUC	Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
NK	<i>Natural Killer</i>
PCR-SSP	<i>Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th	<i>T helpers</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Epidemiologia do Carcinoma Gástrico.....	16
Figura 2 – Histologia da mucosa gástrica	17
Figura 3 – Diagrama da evolução para adenocarcinoma gástrico.....	19
Figura 4 – Estrutura tridimensional da molécula de IL-4 determinada por cristalografia.....	21
Figura 5 – Estrutura tridimensional da molécula de IL-6 determinada por cristalografia.....	22
Figura 6 – Actividade biológica da IL-6.	23
Figura 7 – Estrutura tridimensional da molécula de IL-10 determinada por cristalografia.....	23
Figura 8 – Regulação da resposta imunitária pela IL-10.....	24
Figura 9 – Propriedades imunossupressoras do TGF- β	25
Figura 10 – Representação esquemática das posições polimórficas na região promotora do gene da IL-4.....	26
Figura 11 – Representação esquemática das posições polimórficas na região promotora do gene da IL-6.....	26
Figura 12 – Representação esquemática das posições polimórficas na região promotora do gene da IL-10	26
Figura 13 – Representação esquemática das posições polimórficas na sequência codificante do TGF- β	27
Figura 14 – Papel das citocinas no microambiente tumoral..	28
Figura 15 – Papel do TGF- β na progressão do cancro.....	30
Figura 16 – Passos da extracção de DNA.....	32
Figura 17 – Resultado da amplificação por PCR-SSP da amostra AH971/11 para os polimorfismos da IL-4, IL-6, IL-10 e TGF- β	35
Figura 18 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-4 entre indivíduos com GC e CGI.	38
Figura 19 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-6 entre indivíduos com GC e CGI.	39
Figura 20 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-10 entre indivíduos com GC e CGI	40
Figura 21 – Comparação das frequências dos polimorfismos do TGF- β entre indivíduos com GC e CGI.	41

Figura 22 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-4 entre indivíduos com GC e CGD.....	44
Figura 23 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-6 entre indivíduos com GC e CGD.....	45
Figura 24 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-10 entre indivíduos com GC e CGD.....	47
Figura 25 – Comparação das frequências dos polimorfismos do TGF- β entre indivíduos com GC e CGD.....	48

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Características dos dois tipos histológicos de CG.....	16
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da população em estudo.....	31
Tabela 2 – Descrição dos polimorfismos analisados.....	33
Tabela 3 – Parâmetros do programa de PCR utilizado para amplificação dos polimorfismos. ...	34
Tabela 4 – Frequências alélicas e genotípicas em indivíduos com GC e com CGI.....	37
Tabela 5 – Frequências alélicas e genotípicas em indivíduos com GC e com CGD.....	43

I. INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico (CG) é uma das neoplasias malignas mais comuns e fatais em todo o mundo.¹ Nas últimas décadas, a sua mortalidade tem diminuído consideravelmente, no entanto, continua a ser um importante problema de saúde pública, permanecendo uma doença com mau prognóstico e elevada mortalidade.^{2,4} Neste contexto, o CG continua a ser alvo de variados estudos epidemiológicos e genéticos em todo o mundo, incluindo Portugal.

1.1. EPIDEMIOLOGIA

A distribuição do CG não obedece a um padrão geográfico apresentando uma incidência com marcada variação entre os diversos países de todo o mundo. A sua incidência é especialmente elevada em zonas específicas da América Latina, no Este Asiático e Europeu.³ Por outro lado, o CG apresenta baixa prevalência na Europa Ocidental e América do Norte (Figura 1A).³ Esta variação geográfica na distribuição da doença, pode ser explicada pelo facto da etiologia do CG ter uma significativa componente ambiental distribuída diferencialmente por todo o mundo.⁴

Segundo dados de 2008, da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), Portugal é o quarto país da Europa com maior taxa de incidência e mortalidade por CG, apenas superado pela Lituânia, Estónia e Letónia (Figura 1B).⁵ No nosso país, este tipo de tumor é a terceira neoplasia mais comum e letal em mulheres, a seguir aos cancros da mama e colo-rectal, enquanto nos homens ocupa o quarto lugar, abaixo dos cancros da próstata, colo-rectal e do pulmão (Figura 1C).⁵

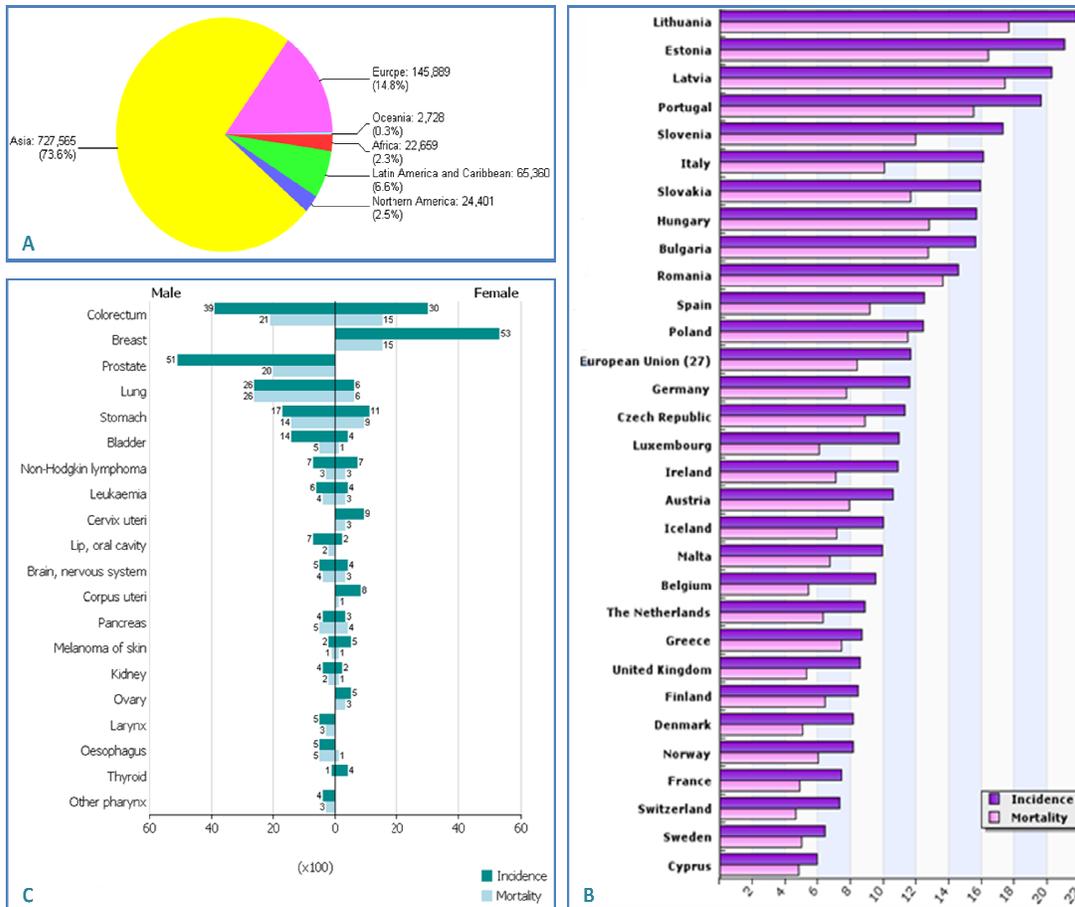


Figura 1 – Epidemiologia do Carcinoma Gástrico. **(A)** Incidência Mundial; **(B)** Incidência e Mortalidade na Europa; **(C)** Distribuição por sexos da incidência e mortalidade em Portugal.⁵

1.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

O CG pode ser classificado anatomicamente, quanto à sua localização, como proximal (carcinoma da cárdia) e distal (carcinoma do corpo e antro).⁶ Estes tipos de tumores variam na incidência de acordo com o local geográfico, o grupo socioeconómico ou étnico.³ Para além da incidência, diferem ainda na susceptibilidade genética, no perfil patológico, na apresentação clínica e no seu prognóstico (Quadro-1).^{6,7}

Quadro 1 – Características dos dois tipos histológicos de CG.

	Intestinal	Difuso
Incidência	População Idosa Mais frequente em homens	Jovens Mais frequentes em Mulheres
Área geográfica	Zonas de alto risco	Zonas de baixo risco
Factores etiológicos	Factores ambientais	Factores genéticos

Cerca de 90% dos CG localizam-se no corpo e antro e dividem-se em dois grandes tipos histológicos, de acordo com o padrão de crescimento.^{8,9} Estes são classificados, segundo Lauren¹⁰, como carcinomas do tipo intestinal (CGI) ou carcinomas do tipo difuso (CGD).

Os CGI têm um padrão glandular, assemelhando-se a glândulas do tracto gastrointestinal (Figura 2B).¹¹ A evolução deste tipo de tumores é caracterizada por uma progressão sequencial relativamente bem definida, no início ocorre a gastrite que progride para atrofia da mucosa, gastrite crónica (GC) atrofica (GCA) seguida de metaplasia intestinal, displasia e carcinoma com a subsequente disseminação metastática.¹¹ Deste modo, os CGI são dependentes da continuidade da inflamação crónica.^{3,12}

Os CGD são menos comuns e são caracterizados por células neoplásicas individualizadas em estroma variável e por vezes em anel de sinete, produtoras de muco (Figura 2B).¹³⁻¹⁵ Desenvolvem-se, seguidamente, à infecção crónica sem passar pelos passos de GCA ou metaplasia intestinal.¹⁶ Neste tipo de tumores não foram identificados passos sequenciais de infecção/proliferação, para além da GC, comum na infecção por *Helicobacter pylori* (HP). Os CGD possuem uma grande propensão para o crescimento intra e transmural, são altamente metastáticos e são caracterizados clinicamente pela rápida progressão e mau prognóstico.^{17,18} Contudo, nem sempre é clara a classificação histológica de CG, uma vez que, 17% dos casos exibem padrões mistos.⁹

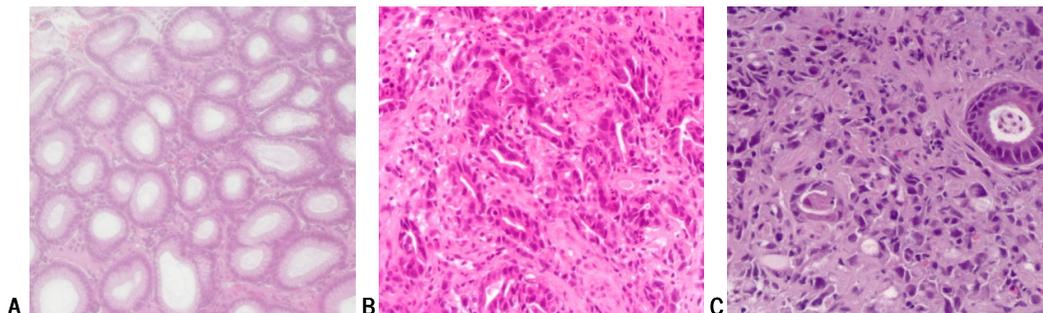


Figura 2 – Histologia da mucosa gástrica. **(A)** Histologia normal da mucosa gástrica (100x, HE); **(B)** Carcinoma gástrico do tipo intestinal (200x, HE); **(C)** Carcinoma gástrico do tipo difuso (200x, HE).

1.3. FACTORES DE RISCO

A causa do CG, tal como a maioria das neoplasias, é multifactorial e resulta da combinação de vários factores ambientais e genéticos.^{3,19} Estes factores interagem entre si potenciando-se mutuamente. Desta forma, o risco de incidência de CG global é maior que a soma do risco dos diversos factores isoladamente.²⁰

1.3.1. Factores ambientais

Os factores ambientais estão associados ao baixo estatuto socioeconómico e à dieta,^{1,3,4,21} nomeadamente, o uso excessivo de sal e comida fumada (que funcionam como irritantes da mucosa gástrica) e o baixo consumo de frutas e vegetais frescos (que resultam numa deficiente ingestão de antioxidantes.^{3,4,21} A infecção por HP, considerada a principal causa deste tipo de carcinomas é, sem dúvida, um dos principais factores ambientais de risco para alterações gástricas.²²

1.3.1.1. *Helicobacter pylori*

A bactéria HP tem um papel específico no desenvolvimento do CG sendo incontornável a sua referência no estudo desta patologia. Esta bactéria é um importante agente patogénico que coloniza as células epiteliais da mucosa gástrica e do duodeno em cerca de 50% da população mundial.²³ Em Portugal, a sua prevalência ronda os 80% em adultos assintomáticos.²⁴ Baseada em estudos epidemiológicos, a *World Health Organization* (WHO) classificou-a, em 1994, como um carcinogénico do tipo I em humanos.²⁵ Na presença de infecção por esta bactéria, o risco de desenvolvimento de neoplasias gástricas, como o adenocarcinoma e o linfoma das células B é aumentado de 3 para 12 vezes.^{21,26,27}

A bactéria HP coloniza a mucosa gástrica e estabelece uma infecção de longo termo.²⁸ Esta infecção induz primeiramente uma gastrite crónica não atrófica superficial (GCNA), podendo progredir para GCA, seguindo-se a metaplasia intestinal, a displasia e, finalmente, o CG (Figura 3.^{25,29-31} A presença de infecção no final desta cascata não é obrigatória para o desenvolvimento de cancro, uma vez que já ocorreram danos irreversíveis potenciadores do desenvolvimento tumoral.³² A gastrite provocada por HP é caracterizada por uma inflamação crónica e severa que pode durar décadas se não for convenientemente tratada.^{33,34} HP induz uma inflamação que promove o desenvolvimento de danos na mucosa e é caracterizada por uma forte infiltração de granulócitos e linfócitos.^{35,36} A indução de inflamação no microambiente do estômago encontra-se, desta forma, associada à produção de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, como o *Tumor Necrosis Factor* (TNF) - α , a Interleucina (IL) -1, IL-6, IL-8 e IL-10.³⁷⁻⁴⁰ A inflamação persistente, provocada pela infecção por HP, pode ainda activar neutrófilos e gerar espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio, importantes agentes mutagénicos e carcinogénicos.^{34,41}



Figura 3 – Diagrama da evolução para adenocarcinoma gástrico.⁴²

1.3.2. Factores genéticos

Nas últimas décadas, muitos estudos demonstraram que as alterações genéticas têm um papel importante no desenvolvimento e progressão do CG.⁴³ Os factores genéticos, determinam a susceptibilidade ou resistência genéticas, de cada indivíduo a carcinogéneos ambientais, destacando-se os genes envolvidos no processo de infecção/inflamação.^{43,44} Entre os marcadores moleculares, as alterações de um único nucleótido, os designados *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), são as variações genéticas mais amplamente estudadas podendo contribuir para a evolução clínica do paciente.^{1,45,46} Os SNPs não causam, por si só, doenças mas estas variações nas sequências de DNA podem potenciar a probabilidade de cada indivíduo desenvolver/ resistir a determinada patologia.^{16,45,47}

Os genes que codificam as citocinas e moléculas relacionadas tem regiões polimórficas nas suas sequências promotoras e codificantes que podem alterar a transcrição dos genes e, desta forma, influenciar o processo inflamatório na resposta a doenças infecciosas.^{44,46} Este controlo genético tem um importante papel na modulação da produção de citocinas, em que as variações inter-individuais dos perfis de SNPs contribuem para a variabilidade da resposta imune, levando a uma

variabilidade de resultados que influenciam o grau de inflamação e o risco de desenvolvimento cancerígeno.^{1,6}

1.3.2.1. Caracterização de Citocinas

As citocinas são um grupo heterogéneo de proteínas ou glicoproteínas solúveis que actuam como mediadores da comunicação célula a célula.^{48,49} Estas moléculas são fundamentais para as funções das células imunes.⁴⁹ As citocinas são secretadas pelas células em resposta a estímulos específicos podendo influenciar a síntese de outras citocinas.^{50,51} Com esta estratégia, as citocinas sintetizadas podem mediar a acção biológica da primeira que as estimulou.⁵² A capacidade de uma citocina aumentar ou suprimir a produção de outra citocina é um mecanismo de regulação importante nas respostas imunes e inflamatórias.^{52,53,54} Além de influenciarem a síntese, as citocinas também podem influenciar a acção de outras citocinas.^{1,55} Duas citocinas podem interagir para antagonizar a acção uma da outra, para produzir efeitos aditivos ou, em alguns casos, para produzir uma interacção simultânea.^{52,53,55}

O início da acção das citocinas dá-se através da sua ligação a receptores específicos que existem na superfície membranar das células-alvo.^{52,55} Os receptores específicos das citocinas apresentam grande afinidade para os seus ligandos. Assim, pequenas quantidades de citocinas produzem grandes efeitos biológicos.^{52,55,56} A expressão destes receptores é, muitas vezes, regulada por sinais específicos.^{52,55} Estes sinais podem ser outras citocinas ou, mesmo, a citocina que se liga especificamente ao receptor, permitindo um retrocontrolo positivo ou negativo.^{52,56}

As citocinas são moléculas pleotrópicas (o mesmo tipo de citocinas pode actuar e ser produzido em diferentes tipos celulares) e redundantes (múltiplas citocinas tem os mesmos efeitos funcionais), podem ter actividade pró- e anti-inflamatória ou imunossupressora dependendo do microambiente circundante.⁵⁷ As múltiplas sobreposições de funções nas citocinas dependem de diversos factores, nomeadamente das suas concentrações locais, do tipo/estadio de maturação das células de resposta e da presença de outras citocinas e seus mediadores.^{48,51} Para muitas células-alvo, as citocinas actuam como reguladores da divisão celular, isto é, actuam como factores de crescimento.^{52,55,56} Algumas citocinas deveriam ser categorizadas como factores de crescimento celular e pertencer ao vasto grupo funcional de polipeptídeos reguladores. Contudo, estas moléculas têm como função principal a sua acção como mediadores da defesa imunitária do individuo e como função secundária a reparação de tecidos.^{52,55-58}

1.3.2.2. Classificação de Citocinas

A classificação de citocinas pode basear-se num grande número de critérios, podendo ser classificadas pelo tipo de células que as produz. Contudo, a classificação mais comum é a classificação em grupos: o das citocinas pró-inflamatórias (ou Th1) e o das citocinas anti-inflamatórias (ou Th2).^{52,55,59} Esta classificação é apenas uma generalização pois algumas citocinas podem ter comportamentos anti e pró-inflamatórios de acordo com o tipo de células em que actuam (ou Th3).^{59,60} Embora existam dezenas de citocinas diferentes, as principais citocinas Th2 e Th3, citocinas com função anti-inflamatória, principal ou secundária, são as IL-4, IL-6 e IL-10 e *Transforming Growth Factor* (TGF)- β .

1.3.2.3. Interleucina-4

A IL-4 foi inicialmente identificada como sendo uma citocina derivada das células *T helpers* (Th), com aproximadamente 20 kD (Figura 4).^{52,61} Esta citocina é um factor de crescimento e de diferenciação dos linfócitos B, que actua tanto na proliferação de células B como na secreção de anticorpos em resposta a proteínas antigénicas.^{50,52,55,62} A IL-4 é também um factor que leva à produção de (Ig)-E.⁵⁰ Apesar de poder ser produzida por outros tipos celulares, as células T CD4⁺ são a maior fonte de IL-4.^{50,52,55}

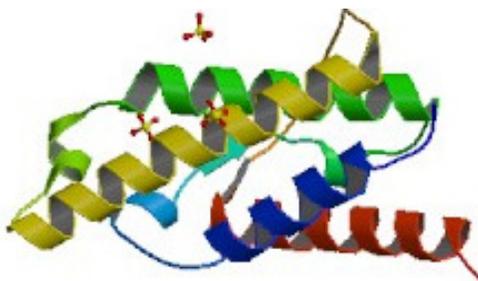


Figura 4 – Estrutura tridimensional da molécula de IL-4 determinada por cristalografia.⁶³

Esta citocina pode antagonizar as acções e inibir a proliferação de citocinas pró-inflamatórias,^{52,55,64} sendo uma das principais responsáveis pela diferenciação dos linfócitos Th em linfócitos Th2.^{50,65,66} Desta forma, a IL-4 partilha com a IL-10 propriedades anti-inflamatórias.^{50,52,65-67} A IL-4 é também conhecida por inibir a activação de macrófagos e estar associada ao desenvolvimento de cancro via supressão da inflamação e inibição directa do crescimento de células tumorais gástricas.⁵⁰

1.3.2.4. Interleucina-6

A IL-6 é uma glicoproteína composta por 184 aminoácidos e com um peso molecular de 26 kDa com actividades anti/pró-inflamatórias (Figura 5).^{68,69} Esta citocina é sintetizada por células mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos, entre outras, como resposta ao aumento de citocinas pró-inflamatórias após a infecção por bactérias gram-negativas.^{52,55,64,70-73} A IL-6 é uma citocina multifactorial com efeitos pleotrópicos, funcionando como mediador da inflamação e como regulador endócrino.^{71,74,75} Esta função reguladora é evidenciada ao nível das células B onde actua como factor de crescimento. Deste modo, em certas situações, a IL-6 pode contrariar os efeitos pró-inflamatórios de outras citocinas adquirindo propriedades anti-inflamatórias (estimulando a resposta Th2).

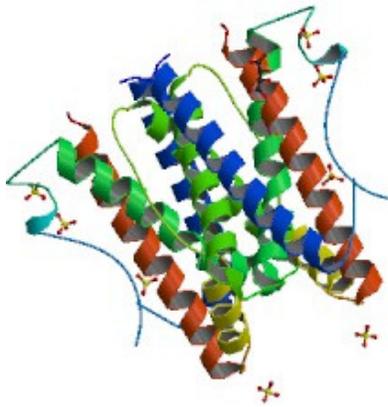


Figura 5 – Estrutura tridimensional da molécula de IL-6 determinada por cristalografia.⁶⁹

Esta citocina está envolvida, ainda, em diferentes processos fisiológicos e patofisiológicos como infecção, inflamação, trauma, metabolismo dos ossos, síntese de proteína C reactiva e carcinogénese (Figura 6).^{50,68,69,75}

Neste último caso, a IL-6 tem um papel fundamental na patogénese e desenvolvimento de neoplasias.^{70,76-78} Esta molécula contribui para o crescimento tumoral através da inibição da apoptose das células cancerígenas e indução da sua angiogénese.⁶⁸

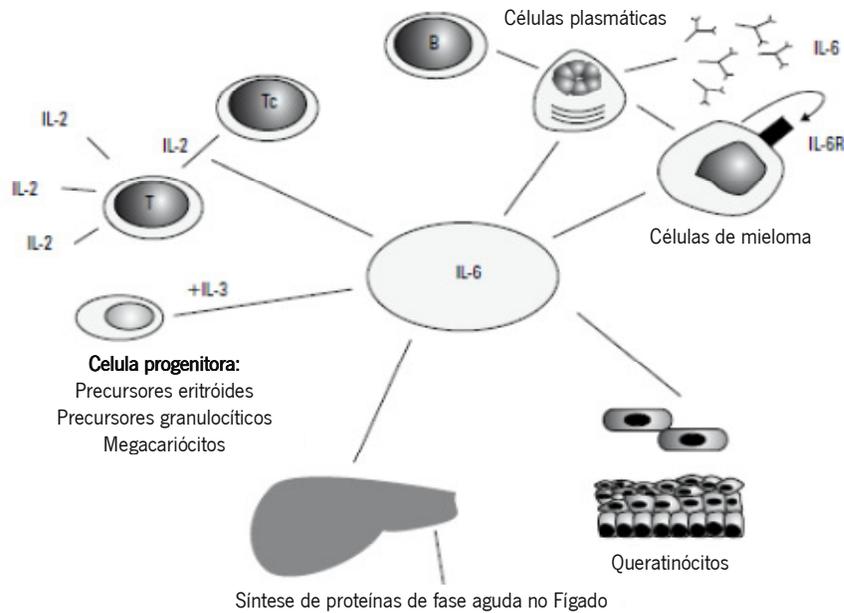


Figura 6 – Actividade biológica da IL-6.⁶⁸

1.3.2.5. Interleucina-10

A IL-10 é, um homodímero com 37 kD de massa, secretada por uma grande variedade de células, tais como, células Th, monócitos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e queratinócitos (Figura 7).^{52,55,77-83} A produção desta citocina ocorre após a activação das células T, mas muito tardiamente quando comparada com as outras citocinas.^{52,79} Esta IL é uma citocina imuno-regulatória com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras.^{79-82,84-86}

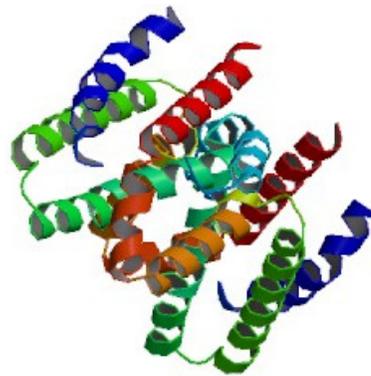


Figura 7 – Estrutura tridimensional da molécula de IL-10 determinada por cristalografia.⁶³

A IL-10 foi descrita, originalmente, como um factor de inibição da produção de citocinas nas células Th1.⁸³ Estudos subsequentes demonstraram que a IL-10 também podia regular as células Th2 e a produção de IL-4 e IL-3.^{82,84} Esta citocina está envolvida na regulação das respostas

inflamatórias influenciando directamente a produção de algumas citocinas pro-inflamatórias (Figura 8).^{79,82,87,88} A IL-10 estimula ainda a diferenciação das células B com posterior secreção de Igs.⁸¹

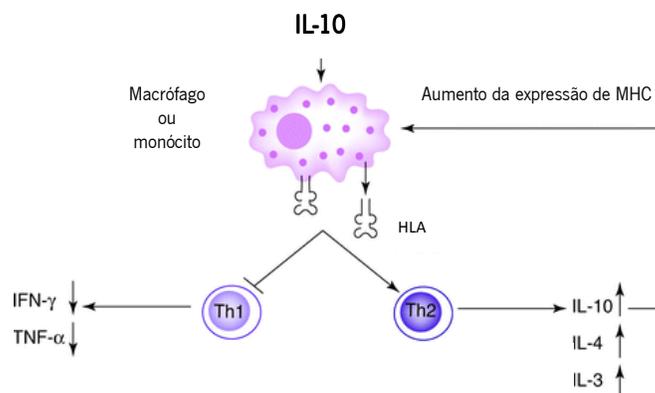


Figura 8 – Regulação da resposta imunitária pela IL-10.⁸⁸

Os verdadeiros efeitos da IL-10 têm sido difíceis de determinar, pois esta molécula apresenta uma variedade considerável de respostas.⁸⁷ Contudo, é sabido que ratos com deficiência nesta citocina desenvolvem inflamações crónicas.⁸⁹ Em estudos *in vitro*, a IL-10 consegue inibir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, tendo um papel crucial na imunossupressão.^{53,79}

1.3.2.6. *Transforming Growth Factor-β*

A descrição original do TGF- β foi feita no campo da biologia tumoral.^{52,53,90} Foi visto que, em determinadas actividades tumorais era produzido um composto, que quando utilizado *in vitro* permitia o crescimento ilimitado de vários tipos de células normais.^{52,53} O TGF- β é uma proteína dimérica com aproximadamente 28 kD.^{52,53,91,92} Esta citocina pode ser sintetizada por quase todos os tipos de células, na sua forma imatura.^{52,93} No entanto, as células T, activadas por antígenos, e as células mononucleares, activadas por lipopolissarídeos, secretam TGF- β biologicamente activo.⁹³

O TGF- β é uma citocina multi-factorial e extremamente pleotrópica.^{17,92,94,96} Esta citocina apresenta vários papéis críticos em diversas vias celulares, destacando-se o crescimento celular, a motilidade, a apoptose, a diferenciação e as reacções imunes.^{17,44,92,95} O TGF- β é uma potente citocina Th3 que tem um papel preponderante na modulação da resposta inflamatória. A via Th3 caracteriza-se pela supressão da actividade de macrófagos e células *Natural killer* (NK), bem como, pela inibição da proliferação de linfócitos B e/ou T.^{96,97} Neste sentido, o TGF- β funciona

como um “anti-citocinas” que sinaliza a extinção das respostas imunes (Figura 9).^{95,97} *In vivo*, muitos tumores podem escapar à resposta imune secretando elevadas quantidades desta citocina.^{17,93,96-99}

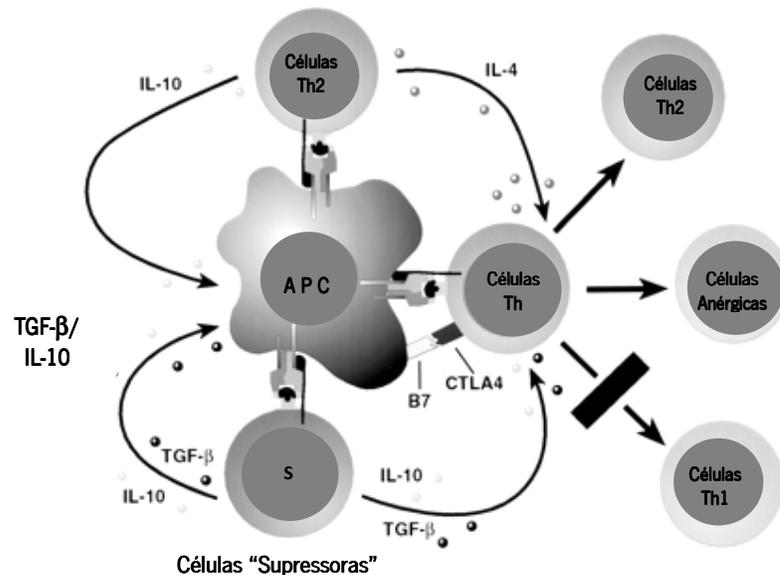


Figura 9 – Propriedades imunossupressoras do TGF-β. (APC- células apresentadoras de antígenos).¹⁰⁰

1.3.2.7. Polimorfismos genéticos em citocinas

No sistema imunitário, respostas diferentes à estimulação das citocinas podem exercer controlo no balanço pró/anti-inflamatório.¹⁰¹ A sua perturbação, em qualquer dos sentidos, pode ter implicações clínicas graves na maioria das doenças infecciosas.^{3,6,14} Muito do interesse científico tem vindo a ser aplicado no estudo do polimorfismo genético das citocinas e do seu papel neste balanço.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Alguns destes polimorfismos têm origem exónica e podem levar a uma substituição de aminoácidos e à alteração da função/actividade da proteína¹⁰⁶, enquanto que outros situam-se na zona promotora.¹⁰⁷ Estes últimos podem interromper ou abolir a regulação da transcrição quer por elementos reguladores, quer por outros genes envolvidos nas vias de sinalização da tradução.¹⁰⁷ Muitos estudos têm-se direccionado na análise da influência, destes dois tipos, de polimorfismos na expressão e actividade das citocinas.^{108,109}

Existem vários polimorfismos descritos no gene da IL-4, nomeadamente os polimorfismos da região promotora nas posições -1098 (T para G), -590 (C para T) e -33 (de C para T) (Figura 10).^{62,64} As associações destes polimorfismos formam os haplótipos TCC (alto produtor) e GTT (baixo produtor) sendo os restantes considerados produtores intermédios (altos ou baixos

consoante a combinação de mutações).^{62,64} Estes polimorfismos têm vindo a ser associados ao nível da expressão da própria citocina e aos níveis totais de IgE no sangue.^{62,64}

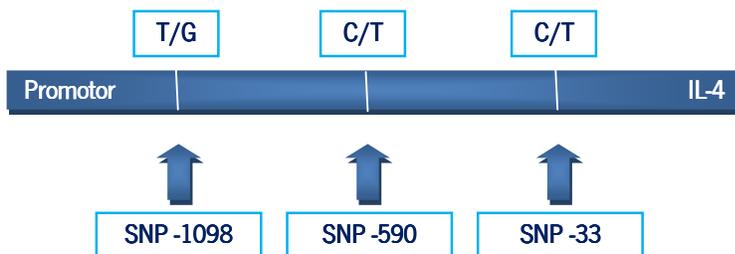


Figura 10 – Representação esquemática das posições polimórficas na região promotora do gene da IL-4.

No gene da IL-6 têm sido relatados vários polimorfismos, alguns dos quais referidos como reguladores prováveis da sua expressão.^{50,68,78} Na região promotora deste gene, uma substituição de C para G na posição -174 está associada a diferentes níveis de produção desta citocina.^{60,67,70,71,75,108,110} Também é característica desta IL, uma substituição de G para A no nucleótido 565 (Figura 11), formando os haplótipos GG, GA (altos produtores), CG e CA (baixos produtores).^{60,71,108}

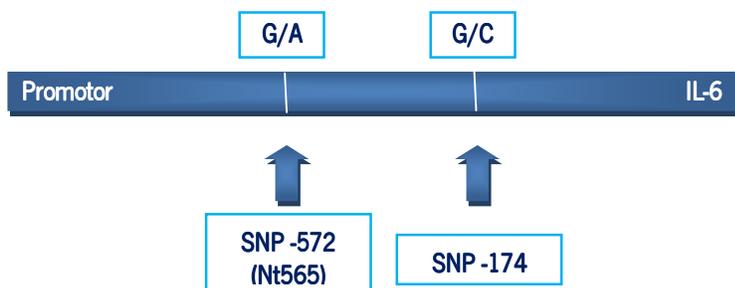


Figura 11 – Representação esquemática das posições polimórficas na região promotora do gene da IL-6.

As mutações na IL-10 têm vindo a ser objecto de estudo em várias patologias.^{85,111-114} Dentro dos polimorfismos da IL-10, os mais investigados estão localizados na região promotora, mais precisamente, nas posições -1082 (G para A), -819 (C para T) e -592 (C para A) (Figura 12) a partir do local de início da transcrição influenciando a transcrição de RNAm de IL-10 e a expressão de IL-10.^{102,112-116} Estes SNPs produzem três haplótipos principais: GCC, associado a elevada produção da citocina, ACC, associado a produção intermédia da citocina, e ATA, haplótipo de baixa produção da citocina.^{6,81,82,87,112-116}

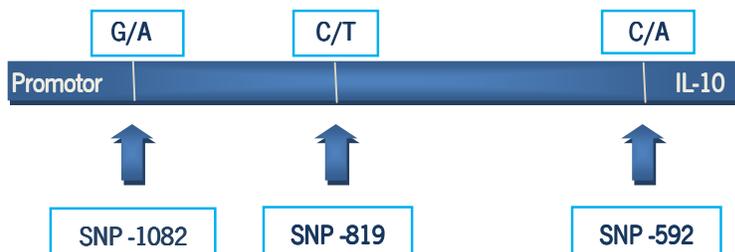


Figura 12 – Representação esquemática das posições polimórficas na região promotora do gene da IL-10.

Finalmente, os polimorfismos mais estudados do TGF- β , ao contrário das restantes citocinas, localizam-se na região codificante do gene nas posições +869 (T para C) e +915 (G para C), codão (cod) 10 e 25, respectivamente (Figura 13).^{60,98,108} Estas mutações têm vários efeitos na produção/atividade da citocina, nomeadamente, na alteração da função do peptídeo sinal e da sua secreção para a circulação. As variações genéticas deste factor têm sido associadas a diferentes condições clínicas em diversas patologias.^{98,117} As combinações destes polimorfismos formam os haplótipos TG, associado a uma actividade/produção normal, CC, associado a uma actividade/produção diminuída, TC e CG, com actividade/produção intermédia.

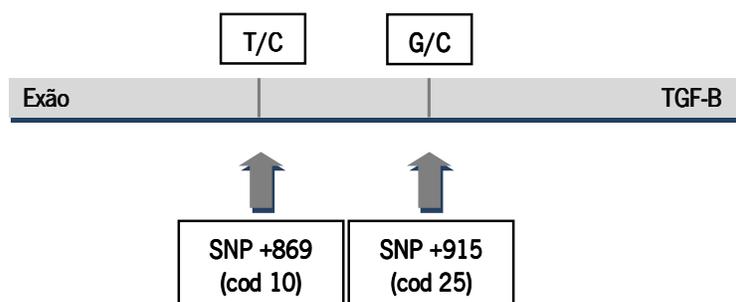


Figura 13 – Representação esquemática das posições polimórficas na sequência codificante do TGF- β .

1.3.2.8. Polimorfismos de citocinas e carcinoma gástrico

O papel dos polimorfismos de citocinas na biologia da inflamação e, conseqüentemente, na biologia de várias desordens neoplásicas, tem sido extensivamente estudado.^{46,48} Dados clínicos demonstraram a diminuição do rácio de células Th1/Th2 circundantes, e citocinas associadas, em diferentes tipos de condições, incluindo os processos inflamatórios associados ao aumento do risco de cancro.^{46,57,87} A expressão alterada de citocinas pró/anti-inflamatórias tem, desta forma, um papel crucial na promoção de diferentes tipos de tumores incluindo o CG.⁸⁷ Estas observações sugerem que a inflamação crónica, regulada essencialmente por citocinas, têm um poderoso efeito na iniciação e desenvolvimento de tumores.^{6,118-123} Deste modo, as citocinas regulam o crescimento, a migração e a diferenciação dos diferentes microambientes tumorais (Figura 14).^{57,124}

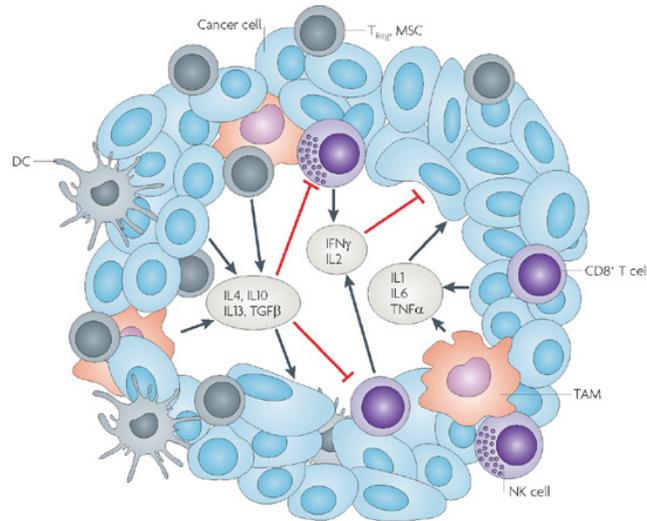


Figura 14 – Papel das citocinas no microambiente tumoral. (TAM- Macrófagos associados ao tumor; Treg- Linfócitos T reguladores; DC- Células dendríticas; MSC- Células supressoras mielóides).⁵⁷

Neste contexto, os polimorfismos da IL-4 parecem estar relacionados com o desenvolvimento de CG, uma vez que as suas variantes polimórficas afectam a transcrição do gene e, conseqüentemente, os níveis de citocina produzida.⁶⁴ Indivíduos com o genótipo -590 TT produzem altos níveis de IL-4 quando comparados com o genótipo CC.⁶⁴ A resposta Th2 representada por esta citocina é esperada ter um papel protector no desenvolvimento de cancro.⁶⁴ Apesar dos vários estudos realizados até à data serem controversos, Wu e seus colaboradores¹²⁶ foram os primeiros a demonstrar, em 2003, que uma alta prevalência de CGD é observada nos portadores do alelo C quando comparado com o genótipo TT, o que sugere que esta baixa produção de IL-4 é responsável pelo desenvolvimento de CG.¹²⁶ No entanto, outros estudos falharam ao tentar demonstrar alguma associação entre polimorfismos da IL-4 e o risco de doença.¹²⁷ Recentemente, Sugimoto e colegas⁶⁴ comprovaram que o efeito protector do polimorfismo -590 da IL-4 é significativo para o CG e úlcera péptica em pacientes com genótipo alto produtor na população ocidental, uma vez que os níveis de IL-4 têm um poderoso efeito inibitório nas células cancerígenas pela indução da apoptose.^{62,64}

Também os polimorfismos da IL-6 têm sido associados à prevalência, incidência e/ou prognóstico de uma variedade de doenças entre as quais o CG.^{69,71,75,76,78,110} Estes polimorfismos são capazes de alterar a transcrição do gene, influenciando desta forma os níveis plasmáticos de IL-6.^{70,71,75,78} Assim, homozigóticos para o alelo -174G demonstraram ter maior actividade transcricional do gene IL-6, elevados níveis plasmáticos de IL-6 e aumento da indução da resposta da IL-6 que os indivíduos homozigóticos para o alelo C.^{69,70,74} Gatti *et al.*¹²⁸ reportaram que portadores do alelo G têm uma

incidência significativamente mais alta de CG enquanto Kamangar *et al.*²⁹ demonstraram que, comparado com o genótipo GG, o genótipo baixo produtor CC tem um aumento de risco de CG, enquanto outros estudos não demonstraram qualquer relação significativa do polimorfismo da IL-6 nesta posição com doença gástrica. Deste modo, as concentrações de IL-6 podem depender do desenvolvimento do tumor e correlacionar-se com a sobrevivência.¹²⁹ Wallner *et al.*¹³⁰ encontraram uma associação positiva entre a concentração de IL-6 e o estadió do CG, reforçando a ideia de que a IL-6 influencia o desenvolvimento carcinogénico. Assim, elevadas concentrações desta citocina associam-se a prognóstico negativo de CG, isto é, com maior risco de disseminação e recorrência.^{6,116,130}

Em relação aos polimorfismos da IL-10, ficou demonstrado que os portadores dos alelos -1082G, -819C e -592C (haplótipo GCC) têm níveis superiores de RNAm que os portadores do haplótipo ATA.^{6,81,82,87,112,115,116} Estes resultados confirmam a relevância do polimorfismo da IL-10 na regulação da resposta inflamatória.^{6,81,82,87,112,115,116} El-Omar *et al.*¹³¹, demonstraram que certos polimorfismos em genes de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, estão associados ao aumento do risco de CG. Pacientes homozigóticos para os alelos hipoactivos da IL-10, -1082A e -592A, assim como o haplótipo baixo produtor ATA (-1082A, -819T, -592A) têm um risco significativo de desenvolver CG estando associados a um pior prognóstico e o haplótipo GCC parece estar associado a um melhor prognóstico.¹³¹ No entanto, noutros estudos, como por exemplo, um conduzido por Liu⁸², o alelo -1082G foi associado com o aumento significativo do risco de CG quando comparado com o alelo A e o haplótipo GCC (-1082G, -819C e -592C) foi associado com o aumento significativo do risco de CG quando comparado com o haplótipo ATA.⁸²

Quanto aos polimorfismos do TGF- β , não existem muitos estudos que o associem ao CG, sabe-se apenas que existem vários SNPs com possível significado funcional na expressão do gene.¹¹⁷ Certas variantes polimórficas do TGF- β são funcionalmente distintas e estão associados com o aumento dos níveis de TGF- β o que pode influenciar o risco de cancro.^{98,117} O gene TGF- β é um bom candidato a modular o risco de CG, está envolvido em múltiplos processos celulares importantes e tem um papel bifásico na carcinogénese.^{6,17,95} Nos estádios iniciais, o TGF- β actua como um supressor tumoral inibindo a proliferação celular ou promovendo a diferenciação celular e a apoptose.^{17,96,98} Em estádios mais avançados, contudo, as células tumorais adquirem resistência a esta inibição do crescimento, começando até a secretar altos níveis de TGF- β transformando-se num promotor do tumor por estimulação da angiogénese e da motilidade celular, suprimindo a

resposta imune e aumentando a interação das células tumorais com a matriz extracelular, o que leva a progressiva invasão e metastização (Figura 15).^{17,96,98}

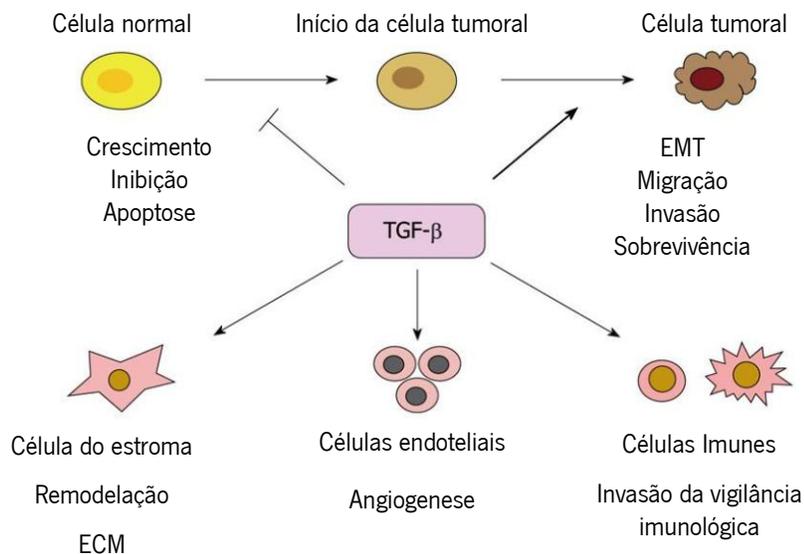


Figura 15 – Papel do TGF- β na progressão do cancro.⁹⁶

1.4. OBJECTIVOS

Estudos de pesquisa de marcadores genéticos no CG são de extrema importância, uma vez que podem ter influência no diagnóstico, prognóstico e terapêutica da doença. Nesta perspectiva, torna-se pertinente o estudo dos polimorfismos mais comuns dos genes envolvidos na inflamação e o seu papel no desenvolvimento e progressão desta patologia. Este trabalho teve como objectivo principal determinar a distribuição da frequência dos polimorfismos IL-4, IL-6, IL-10 e TGF- β em indivíduos com CG e com GC. Paralelamente pretendeu-se averiguar a existência de correlação positiva entre variações genéticas destes genes e a prevalência da doença em indivíduos portugueses.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. POPULAÇÃO

Foram utilizadas 50 amostras de GC e 100 amostras de CG 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 (IAP-FMUC) de acordo com o seu tipo histológico. O tratamento e processamento das amostras foram efectuados no laboratório de Patologia Molecular deste Instituto.

2.1.1. População com carcinoma

As 100 biopsias de CG correspondiam a 61 indivíduos do sexo masculino e 39 indivíduos do sexo feminino com uma média de idades de 70 anos tendo sido aplicada a classificação histológica de Laurén: CGD (n=50), 30 dos quais indivíduos do sexo masculino e 20 do sexo feminino, com uma média de idades de 65 anos; e CGI (n=50), 31 do sexo masculino e 19 do sexo feminino, com uma média de idades de 73 anos (Tabela 1).

2.1.2. População com gastrite

Como grupo controlo foram utilizadas 50 biopsias de GC correspondentes a 31 indivíduos do sexo masculino e 19 indivíduos do sexo feminino com uma média de idades de 47 anos (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização da população em estudo.

		CG (n=100)	CGI (n=50)	CGD (n=50)	GC (n=50)
	Média de idades (anos)	70	73	65	47
Sexo	Masculino	39 (39%)	19 (38%)	20 (40%)	31(62%)
	Feminino	61 (61%)	31 (62%)	30 (60%)	19 (38%)

2.2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

2.2.1. Extracção de DNA



Figura 16 – Passos da extração de DNA.¹³²

A extração de DNA foi realizada, a partir de biopsias gástricas incluídas em parafina, com recurso a um kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Califórnia, EUA).¹³² Inicialmente foi efectuada microdissecção do bloco, seguida de colocação de 10 a 20 cortes de 10µm de espessura de cada amostra em tubo de 1,5ml e adição de 1200µl de xilol para dissolução da parafina. Após agitação no vórtex durante 15 segundos e centrifugação à velocidade máxima e à temperatura ambiente, o sobrenadante (xilol) foi removido, e o *pellet* lavado com 1200µl de etanol (100%). Após nova agitação no vórtex durante 15 segundos, centrifugação à velocidade máxima e à temperatura ambiente e remoção do sobrenadante (etanol), as amostras foram incubadas na estufa a 37°C durante 15 minutos para evaporação do restante etanol. Para assegurar uma lise eficaz foi adicionado ao *pellet* 20µl de QIAamp® proteinase K e 180µl Tampão QIAamp® ATL seguido de agitação no vórtex durante 15 segundos e posterior incubação num banho agitado a 56°C “over-night”. Nesta fase o DNA atinge o máximo de rendimento após a lise celular. Na etapa seguinte, depois da adição de 200µl de etanol absoluto (Merck, Darmstad, Alemanha) e agitação no vórtex, a mistura obtida foi transferida para colunas QIAamp® Mini Spin (que contêm uma membrana à qual o DNA se liga). Depois da centrifugação a 6000g durante 1 minuto, cada coluna QIAamp® Mini Spin foi transferida para um novo tubo de 2ml. Após abertura cuidadosa das colunas, adição de 500µl de tampão de lavagem QIAamp® AW 1 e centrifugação a 6000g durante 1 minuto, as colunas foram novamente transferidas para tubos novos de 2ml. O passo anterior foi repetido, mas com a adição de 500µl de tampão de lavagem QIAamp® AW2 e centrifugação a alta velocidade (20000 g) durante 3 minutos. Finalmente, as colunas foram transferidas para tubos limpos de microcentrifuga, seguida da adição de 200µl de tampão de eluição QIAamp® AE, incubação à temperatura ambiente (15°-25°C) durante 3 minutos e centrifugação a 6000g durante 1 minuto. Por fim, descartaram-se as colunas e os tubos contendo o DNA foram armazenados - 20°C (Figura 16).¹³²

2.2.2. Análise de Pureza e Quantificação do DNA Extraído

As amostras de DNA foram quantificadas num espectrofotómetro GeneQuant Pro (Biochrom, Cambridge, Inglaterra), utilizando tampão de eluição QIAamp® AE como referência e 7µl das amostras de DNA para a quantificação da concentração de DNA e determinação da pureza da amostra, através da leitura a densidades ópticas adequadas. A um comprimento de onda de 280nm foi detectada a existência de nucleótidos e de proteínas. A 260nm foi detectada apenas a existência de nucleótidos e 230 nm a presença de sais na amostra.¹³³

2.2.3. Tipagem Genética

A técnica baseia-se na amplificação específica, de regiões alélicas definidas. Este conjunto de *primers* discrimina vários pontos polimórficos dos seguintes genes codificantes: IL-4 -1098 T> G, IL-4 -590 C> T, IL-4 -33 C> T, IL-6 nt565 G> A, IL-6 -174 C> G, IL-10 -1082 G> A, IL1-0 -819 C> T, IL-10 -592 C> A, TGF-β cod10 T> C e TGF-β cod25 G> C (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos polimorfismos analisados.

	NCBI SNP DataBase	Região do gene	Posição	Alelos
IL-4	rs2243248	Promotor	-1098	T> G
	rs2243250	Promotor	-590	C> T
	rs2070874	UTR	-33	C> T
IL-6	rs1800795	Promotor	-174	C> G
	rs1800797	Promotor	nt565	G>A
IL-10	rs1800896	Promotor	-1082	G> A
	rs1800871	Promotor	-819	C> T
	rs1800872	Promotor	-592	C> A
TGF-β	rs1800470	Codão 10	+869	T> C
	rs1800471	Codão 25	+915	G> C

Os *primers* utilizados foram desenhados a partir da sequência dos genes pretendidos (Tabela 2) obtidos por colaboração com a Genebox (Biocant- Cantanhede; Portugal) “Cytokine Box Kits”.

2.2.3.1. Amplificação por *Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers* (PCR-SSP)

Agitaram-se brevemente os tubos de DNA e da mistura de reacção “Cytokine Box Kit” (Genebox, Cantanhede, Portugal) e em cada poço da placa de tipagem foram colocados 5µl do par de *primers* específicos, 2µl de DNA de cada amostra e 3 µl da mistura de reacção, num total de 4

amostras por placa de tipagem. As placas foram seladas com uma cápsula e colocadas num termociclador MyCycler Personal (BioRad, Califórnia, EUA) de 96 poços, de acordo com o programa da Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros do programa de PCR utilizado para amplificação dos polimorfismos.

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	96°C	1'	1
Desnaturação	96°C	25''	5
Emparelhamento	70°C	45''	
Extensão	72°C	30''	
Desnaturação	96°C	25''	21
Emparelhamento	65°C	45''	
Extensão	72°C	30''	
Desnaturação	96°C	25''	4
Emparelhamento	55°C	1'	
Extensão	72°C	2'	
Extensão final	72°C	10'	1

2.2.4. Electroforese em Gel de Agarose

Após amplificação, as reacções de PCR foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose Seakem ME (Biowhittaker Molecular Aplications, Rockland, EUA) a 2% em TAE 1X (0,04 M Tris base (CalBiochem, EUA), 0,02M Ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1 mM EDTA-Na₂) e corados com 0,8µg/ml brometo de etidio (Sigma Chemical, St Louis, EUA). A electroforese decorreu durante 15 minutos na voltagem máxima e os produtos de PCR foram visualizados à luz UV num transiluminador, usando o marcador TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA) como referência.¹³⁴ Os resultados foram registados em fotografia digital, através de programa ZomBrowser EX – Canon.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.3.1. Frequências Alélicas e Genotípicas dos Polimorfismos Estudados

As relações entre as amostras, com CGD e GC e com CGI e GC, foram calculadas com a ajuda do programa STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc., 2009), baseando-se no teste do Qui-Quadrado 2x2 (quando n > 5) e no Teste Exacto de Fisher (quando n < 5). Os resultados foram considerados significativos quando p ≤ 0,05.

III. RESULTADOS

3.1. PUREZA E CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A determinação da concentração e da pureza das amostras biológicas foi realizada em 60 dos 150 DNAs estudados.

Em relação à concentração de DNA verificou-se que esta tinha valores médios aproximados a 20,6 ng/μl e inferiores ao recomendável (100-200ng/μl) para o uso da metodologia PCR-SSP.¹³³ No que diz respeito à pureza das amostras, algumas mostraram possuir altas quantidades de proteínas enquanto outras apresentaram graus de degradação elevados, devido à origem de material parafinado. Contudo apesar da existência de amostras que se desviaram dos padrões, tanto na concentração como na qualidade de DNA, a maioria das amostras apresentou um grau de eficiência aceitável sem quaisquer problemas na amplificação por PCR-SSP (Figura 17).

Nesta figura, além de demonstrar a eficiência do PCR-SSP em amostras com baixas concentrações

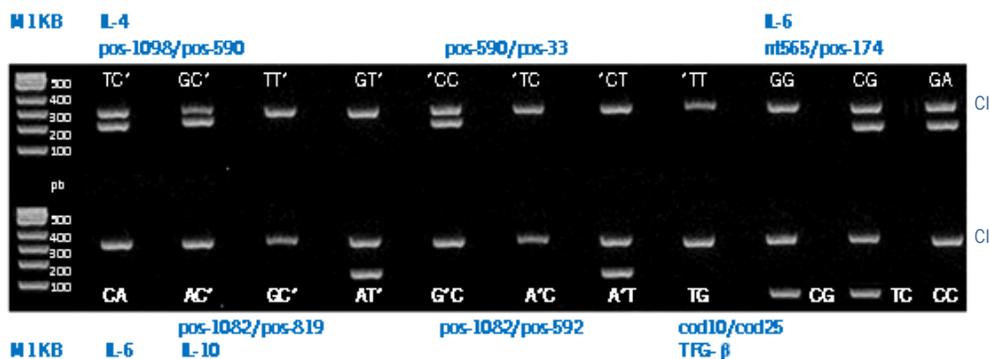


Figura 17 – Resultado da amplificação por PCR-SSP da amostra AH971/11 para os polimorfismos da IL-4, IL-6, IL-10 e TGF-β (CI-controlo interno).

e com níveis elevados de degradação, permite ver claramente que os polimorfismos estudados nestas citocinas foram confirmados quer pelos primers forward quer pelos reverse. Usando como exemplo a IL-4, para as posições -1098 e -590, o primer forward detecta as variantes polimórficas na posição -1098 e o primer reverse detecta as alterações polimórficas na posição -590. A posição -590 é ainda confirmada pelo conjunto de primers seguintes. Desta forma, a amostra AH971/11 é heterozigótica para a posição -1098, possuindo os alelos T e G e homozigótica para as posições -590 e -33 possuindo nas duas posições o alelo C.

3.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS NO CARCINOMA GÁSTRICO INTESTINAL *VERSUS* GASTRITE CRÔNICA

Na comparação das frequências alélicas e genotípicas de indivíduos com GC e com CGI, utilizaram-se 50 DNAs de indivíduos com GC e 50 DNAs de indivíduos com este tipo histológico de carcinoma (Tabela 4).

Das 10 posições polimórficas analisadas (-1098, -590, -33, nt565, -174, -1082, -819, -592, cod10 e cod25) para os 4 genes de citocinas em estudo (IL-4, IL-6, IL-10 e TFG- β), foram encontradas diferenças com significado estatístico para 5 nomeadamente, nas posições -590 e -33 da IL-4; na posição -174 da IL-6; na posição -1082 da IL-10 e no cod25 do TFG- β (Tabela 4). A partir deste ponto, serão apenas apresentados os resultados significativamente estatísticos.

Relativamente aos polimorfismos no gene da IL-4 registaram-se diferenças significativas entre os dois grupos de indivíduos para as frequências alélicas e genotípicas nas posições -590 e -33 (Tabela 4).

Na posição -590 da IL-4, verificou-se que o alelo C, alto produtor, apresenta maior prevalência no grupo de pacientes com gastrite crónica (84% *vs* 72%), enquanto o alelo T, baixo produtor, é mais frequente no grupo com carcinoma gástrico intestinal (28% *vs* 16%), evidenciando assim diferenças significativas entre os dois grupos ($p=0,0418$) (Figura 18A). Em relação ao genótipo -590 da IL-4, também se verificaram diferenças significativas entre o grupo de pacientes com carcinoma gástrico intestinal e o grupo de pacientes com gastrite crónica (Tabela 4). O genótipo, intermédio, CT apresentou menor frequência no grupo de gastrite (4% *vs* 11%, $p=0,0087$) enquanto o genótipo, de baixa produção, TT registou menor prevalência nos indivíduos com carcinoma gástrico intestinal (18% *vs* 40%, $p=0,0172$) (Figura 18B). Na análise da posição -33 da IL-4, o alelo C, alto produtor, registou maior prevalência no grupo de gastrite crónica (91% *vs* 72%), sendo o alelo T, baixo produtor, mais frequente no grupo com carcinoma gástrico intestinal (28% *vs* 9%), obtendo-se desta forma diferenças bastante significativas entre os dois grupos ($p=0,0007$) (Figura 18C). Também o genótipo, alto produtor, -33CC e o genótipo, baixo produtor, -33TT apresentaram diferenças com significado estatístico entre os dois grupos de indivíduos (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequências alélicas e genóticas em indivíduos com GC e com CGI (p- Probabilidade, N.S- Não significativo).

Posição	Alelo	Frequências alélicas				p GC vs CGI	Genótipo	Frequências genóticas				p GC vs CGI
		GC		CGI				GC		CGI		
IL-4		n(100)	%	n(100)	%		n(50)	%	n(50)	%		
-1098	T	75	75	75	75	N.S	GG	3	6	3	6	N.S
	G	25	25	25	25	N.S	TG	19	38	19	38	N.S
							TT	28	56	28	56	N.S
-590	T	16	16	28	28	0,0418	CC	28	56	30	60	N.S
	C	84	84	72	72	0,0418	CT	2	4	11	22	0,0087
							TT	20	40	9	18	0,0172
-33	T	9	9	28	28	0,0007	CC	41	82	30	60	0,0172
	C	91	91	72	72	0,0007	CT	9	18	11	22	N.S
							TT	0	0	9	18	0,0022
-1098/-590/-33							TTT-TTT	0	0	8	16	0,0040
	TCC	60	60	47	47	N.S	TCC-TCC	19	38	0	0	<0,0001
	TTT	9	9	28	28	0,0007	TTT-TCC	3	6	6	12	N.S
	GCC	25	25	25	25	N.S	GCC-GCC	3	6	2	4	N.S
	TCT	0	0	0	0	N.S	GCC-TCC	19	38	14	28	N.S
	TTC	6	6	0	0	0,0139	GCC-TTT	0	0	6	12	0,0132
							TTC-TTT	6	12	0	0	0,0132
						TTC-TTC	0	0	14	28	0,0001	
IL-6												
-174	G	56	56	58	58	N.S	GG	25	50	8	16	0,0005
	C	44	44	42	42	N.S	CG	6	12	25	50	0,0001
							CC	19	38	17	34	N.S
Nt565	G	78	78	81	81	N.S	GG	38	76	39	78	N.S
	A	22	22	19	19	N.S	AG	3	6	3	6	N.S
							AA	9	18	8	16	N.S
-174/nt565							GG-GG	19	38	3	6	0,0002
	GG	47	47	31	31	0,0214	GG-CA	0	0	3	6	N.S
	CA	13	13	8	8	N.S	GG-CG	6	12	22	44	0,0006
	CG	31	31	50	50	0,0068	CG-CG	13	26	14	28	N.S
	GA	9	9	11	11	N.S	CA-CA	6	12	3	6	N.S
							GG-GA	3	6	0	0	N.S
						GA-GA	3	6	5	10	N.S	
IL-10												
-1082	G	21	21	50	50	<0,0001	GG	13	26	25	50	0,0151
	A	79	79	50	50	<0,0001	AG	3	6	0	0	N.S
							AA	34	68	25	50	N.S
-819	C	78	78	81	81	N.S	CC	38	76	36	72	N.S
	T	22	22	19	19	N.S	CT	3	6	9	18	N.S
							TT	9	18	5	10	N.S
-590	C	78	78	81	81	N.S	CC	38	76	36	72	N.S
	A	22	22	19	19	N.S	CA	3	6	9	18	N.S
							AA	9	18	5	10	N.S
-1082/-819/-590							GCC-GCC	13	26	25	50	0,0151
	GCC	28	28	50	50	0,0017	GCC-ACC	3	6	0	0	N.S
	ACC	50	50	31	31	0,0068	ACC-ACC	22	44	11	22	0,0213
	ATA	22	22	19	19	N.S	ACC-ATA	3	6	9	18	N.S
							ATA-ATA	9	18	5	10	N.S
TGF-β												
Codão 10	T	60	60	64	64	N.S	TC	22	44	30	60	N.S
	C	40	40	36	36	N.S	TT	18	36	17	34	N.S
							CC	10	20	3	6	0,04
Codão 25	G	44	44	58	58	0,0491	CG	6	12	20	40	0,0019
	C	56	56	42	42	0,0491	GG	19	38	19	38	N.S
							CC	25	50	11	22	0,0044
Cod10+cod25							TG-TG	0	0	11	22	0,0007
							TG-CG	9	18	8	16	N.S
	TG	16	16	36	36	0,0015	TG-TC	3	6	6	12	N.S
	CG	28	28	22	22	N.S	CG-CG	7	14	0	0	0,0073
	CC	12	12	14	14	N.S	CC-CC	0	0	3	6	N.S
	TC	44	44	28	28	0,0194	CC-CG	3	6	0	0	N.S
							CC-TC	9	18	8	16	N.S
							TC-TC	16	32	0	0	<0,0001
						CG-TC	3	6	14	28	0,0042	

O genótipo CC apresentou maior frequência no grupo de gastrite crónica (82% vs 60%, $p=0,0172$) enquanto o genótipo, de baixa produção, TT apenas se observou nos indivíduos com cancro gástrico (18% vs 0%, $p=0,022$) (Figura 18D).

Na análise dos haplótipos -1098/-590/-33 da IL-4 foram encontradas diferenças significativas apenas para os haplótipos TTT ($p\leq 0,0005$) e TTC ($p < 0,05$) (Tabela 4), ambos haplótipos responsáveis pela produção intermédia de IL-4 (Figura 18E). Por outro lado, observaram-se diferenças significativas nas diversas combinações de haplótipos, exceptuando-se as combinações TTT-TCC, GCC-GCC, GCC-TCC (Tabela 4). A combinação de haplótipos de alta produção (TCC-TCC) apenas se observou no grupo de gastrite (38% vs 0%), enquanto que a combinações de produção baixa/intermédia (TTT-TTT; GCC-TTT, TTC-TTC) apenas se observaram no grupo com carcinoma gástrico do tipo intestinal ($p < 0,02$) (Figura 18D).

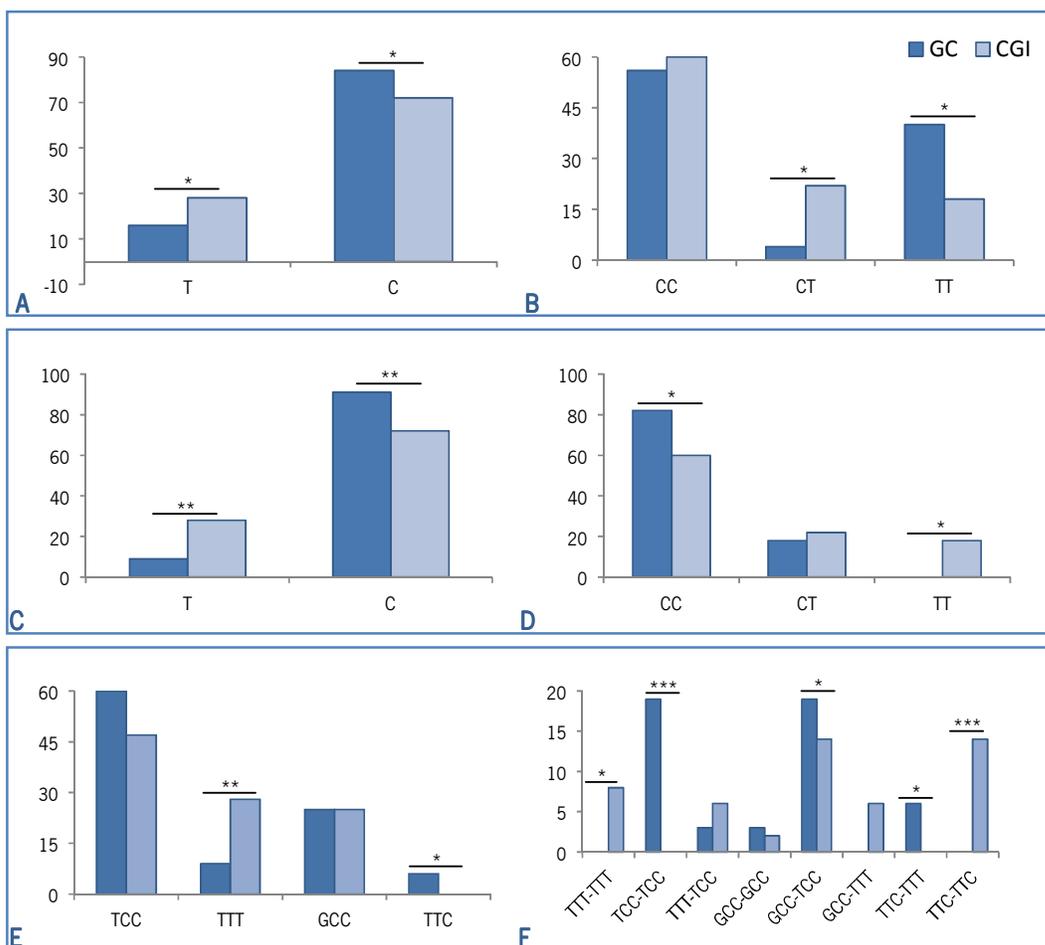


Figura 18 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-4 entre indivíduos com GC e CGI. **(A)** Frequências alélicas e **(B)** genóticas relativas na posição -590 e na posição -33 **(C e D, respectivamente)**. **(E)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos e **(F)** combinações de haplótipos (* $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,001$; *** $p\leq 0,0001$).

Em relação aos polimorfismos da IL-6 não se registaram resultados significativos para as frequências alélicas nas duas posições analisadas, mas registaram-se diferenças com significado estatístico nas frequências genotípicas da posição polimórfica -174 (Tabela 4). Nesta posição, os indivíduos com gastrite crónica apresentaram maior incidência do genótipo, alto produtor, GG (50% *vs* 16%, $p \leq 0,0005$) comparativamente ao grupo com carcinoma gástrico intestinal. Por outro lado, o genótipo, de produção intermédia, CG é o mais prevalente no grupo de pacientes com carcinoma gástrico do tipo intestinal (50% *vs* 12% $p \leq 0,0001$) (Figura 19A).

Foram ainda encontradas diferenças com significado estatístico ao comparar os dois grupos em relação à distribuição de haplótipos, IL-6 -174/nt565 (Tabela 4). O haplótipo, alto produtor, GG foi mais frequente na população com gastrite (47% *vs* 31%, $p = 0,0214$), enquanto o haplótipo CG (baixo/intermédio produtor) foi mais prevalente na população com carcinoma gástrico do tipo intestinal (50% *vs* 31%, $p = 0,0068$) (Figura 19B).

Comparando a combinação de haplótipos IL-6 -174/nt565, nos grupos analisados, obtiveram-se diferenças muito significativas nos haplótipos de alta/intermédia produção, GG-GG ($p = 0,0002$) e GG-CG ($p = 0,0006$) (Tabela 4). Verificou-se também que o haplótipo GG-GG teve uma maior prevalência no grupo com gastrite crónica (38% *vs* 6%), enquanto o grupo com carcinoma gástrico do tipo intestinal tem uma maior prevalência do haplótipo GG-CG (44% *vs* 12) (Figura 19C).

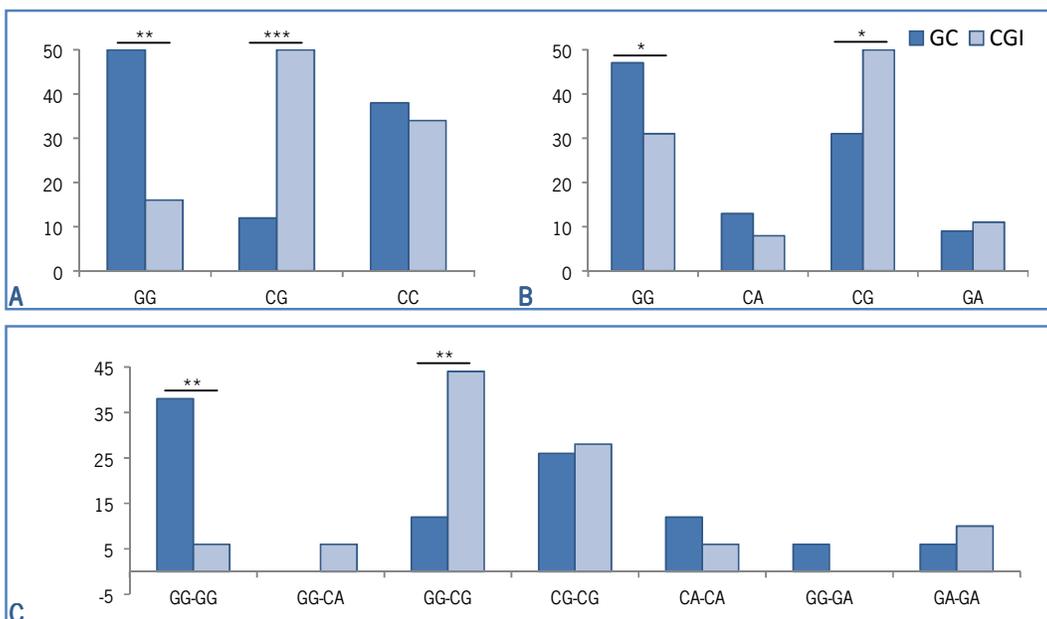


Figura 19 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-6 entre indivíduos com GC e CGI. **(A)** Frequências genotípicas relativas na posição - 174. **(B)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos e **(C)** combinações de haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

No que respeita aos polimorfismos da IL-10 e às distribuições alélicas e genóticas foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) e bastante significativas ($p < 0,0001$) apenas na posição -1082 (Tabela 4). Sendo o alelo, baixo produtor, -1082A e o haplótipo (-1082/-819/-590) ACC, responsáveis pela produção intermédia de IL-10, mais prevalentes na população com gastrite crónica e o genótipo -1082GG e o haplótipo GCC, responsáveis pela alta produção de IL-10, mais frequentes no grupo com carcinoma gástrico do tipo intestinal (Figura 20).

Na análise das combinações de haplótipos da IL-10 verificou-se que apenas as combinações GCC-GCC e ACC-ACC apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 4). O haplogenótipo de alta produção, GCC-GCC, foi mais prevalente no grupo com carcinoma gástrico do tipo intestinal (50% *vs* 26%, $p=0,0151$), enquanto o haplogenótipo de produção intermédia, ACC-ACC, foi mais frequente nos indivíduos com gastrite crónica (44% *vs* 22%, $p=0,0213$) (Figura 20D).

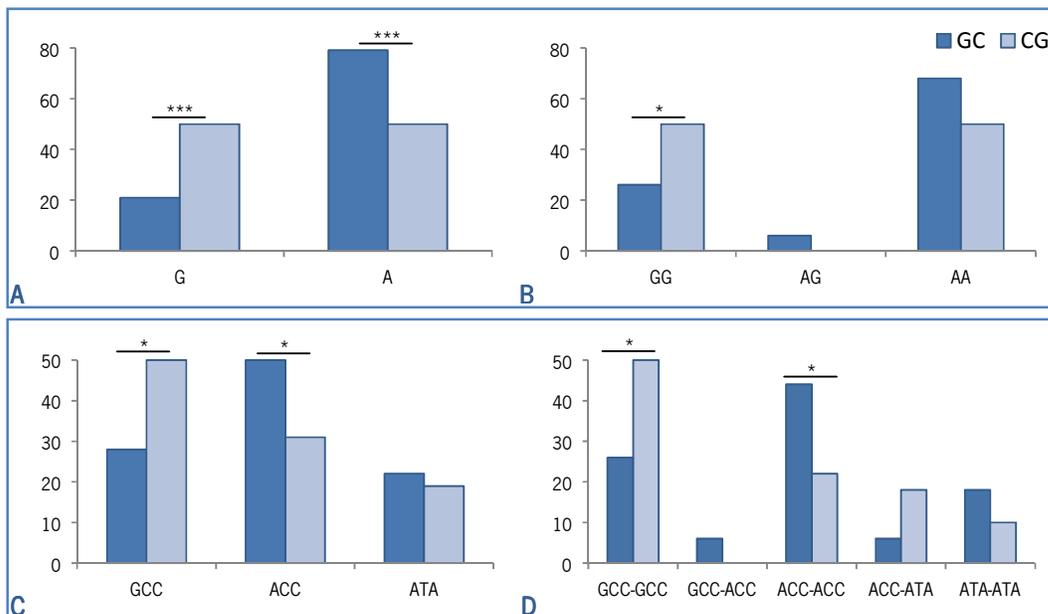


Figura 20 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-10 entre indivíduos com GC e CGI. **(A)** Frequências alélicas e **(B)** genóticas relativas na posição - 1082. **(C)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos e **(D)** combinações de haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

Relativamente aos polimorfismos do TGF- β , foram encontradas diferenças significativas ao confrontar as frequências alélicas e genóticas do grupo com gastrite crónica com o grupo com carcinoma gástrico do tipo intestinal ($p < 0,05$), à excepção das frequências alélicas no codão 10 (Tabela 4). Nos indivíduos com gastrite crónica o alelo C, mutado, do cod25 foi o mais prevalente (56% *vs* 42%) enquanto o alelo G, normal, foi o mais frequente no grupo com carcinoma gástrico intestinal (58% *vs* 44%) (Figura 21A). Quanto às distribuições genóticas do TGF- β , os genótipos

de baixa actividade, cod10CC e cod25CC, foram mais frequentes no grupo de indivíduos com gastrite crónica (20% vs 6%; 50% vs 22%, respectivamente). Por outro lado, o genótipo de actividade intermédia/baixa, cod25CG, foi mais prevalente no carcinoma gástrico intestinal (40% vs 12%) (Figura 21B e 21C).

Comparando os dois grupos em relação aos haplótipos formados pelo cod10/cod25 do TGF- β foram mais uma vez encontradas diferenças significativas (Tabela 4). O haplótipo TG (associado a uma actividade normal do TGF- β) apresentou maior frequência nos indivíduos com carcinoma gástrico do tipo intestinal, comparativamente ao grupo com gastrite crónica, (36% vs 16%, $p=0,0015$). Alternativamente, o haplótipo TC (associado a uma actividade intermédia) apareceu com maior prevalência no grupo com gastrite crónica (44% vs 28%, $p=0,0194$) (Figura 21D).

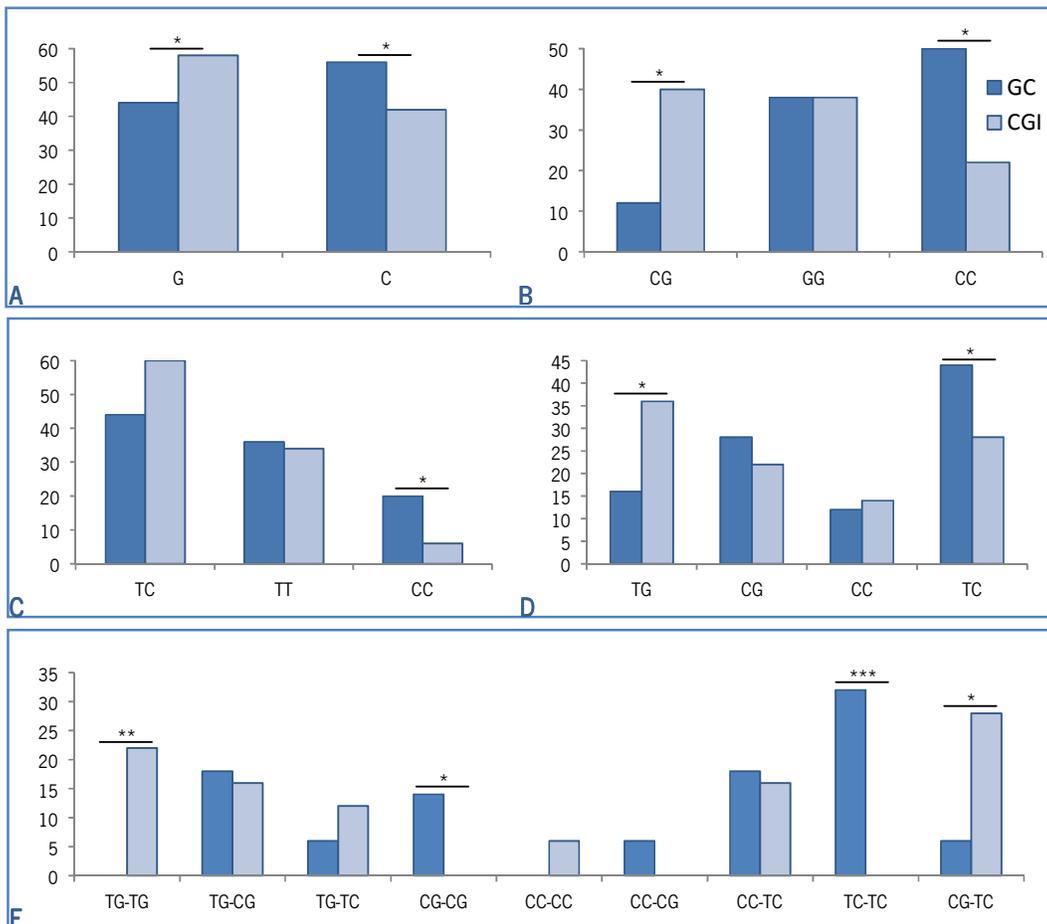


Figura 21 – Comparação das frequências dos polimorfismos do TGF- β entre indivíduos com GC e CGI. **(A)** Frequências alélicas e **(B)** genotípicas relativas no codão 25. **(C)** Frequências genotípicas relativas no codão 10. **(D)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos e **(E)** combinações de haplótipos (* $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,001$; *** $p\leq 0,0001$).

Finalmente, na combinação de haplótipos cod10/cod25 do TGF- β , foram encontradas diferenças com bastante significado estatístico, nomeadamente, as combinações TG-TG, CG-CG, TC-TC e CG-TC. O haplogenótipo, de actividade normal, TG-TG apenas se observou no grupo com carcinoma gástrico do tipo intestinal ($p=0,0007$). Da mesma forma, o haplogenótipo CG-TC também apresentou maior prevalência neste grupo (28% *vs* 6%, $p=0,0042$). Adicionalmente, a combinação de haplótipos, de actividade intermédia, CG-CG e TC-TC apenas se observou no grupo com gastrite crónica ($p\leq 0,0073$) (Figura 21E).

3.3. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS NO CARCINOMA GÁSTRICO DIFUSO *VERSUS* GASTRITE CRÓNICA

Na comparação das frequências alélicas e genotípicas de indivíduos com GC e com CGD, utilizaram-se 50 DNAs de indivíduos com GC e 50 DNAs de indivíduos com este tipo histológico de carcinoma (Tabela 5).

Das 10 posições polimórficas estudadas (-1098, -590, -33, nt565, -174, -1082, -819, -592, cod10 e cod25) para os 4 genes de citocinas em estudo (IL-4, IL-6, IL-10 e TFG- β), foram encontradas diferenças com significado estatístico para todas elas à excepção do codão 10 do TGF- β .

Em relação aos polimorfismos da IL-4, foram encontradas diferenças com significado estatístico entre os dois grupos apenas para as distribuições alélicas na posição -33 e para as distribuições genotípicas nas três posições analisadas do gene (Tabela 5).

Relativamente às frequências alélicas, alelo -33C, alto produtor, é mais frequente na amostra com gastrite crónica (91% *vs* 75%, $p=0,0029$), enquanto o alelo -33T é o mais prevalente na amostra com carcinoma gástrico do tipo difuso (25% *vs* 9%). (Figura 22A).

Os genótipos responsáveis pelo aumento de produção de ILL4, nomeadamente, -1098GG e -590CC são mais frequentes no grupo de indivíduos com carcinoma gástrico do tipo difuso (22% *vs* 6%; 78% *vs* 56%, $p\leq 0,0232$), enquanto o genótipo de produção intermédia, -33CT, é mais prevalente no grupo de indivíduos com gastrite (18% *vs* 4%, $p=0,0172$). Contrariamente, o genótipo -33TT está ausente no grupo com gastrite (0% *vs* 22%, $p=0,0007$) (Figura 22B, 22C e 22D).

Foram também encontradas diferenças com significado estatístico para todos os haplótipos, à excepção dos haplótipos GCC e TCT (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequências alélicas e genotípicas em indivíduos com GC e com CGD. (p- Probabilidade; N.S- Não significativo).

Posição	Alelos	Frequências alélicas				p GC vs CGD	Genótipo	Frequências genotípicas				p GC vs CGD
		GC		CGD				GC		CGD		
IL-4		n(100)	%	n(100)	%		n(50)	%	n(50)	%		
-1098	T	75	75	64	64	N.S	GG	3	6	11	22	0,0232
	G	25	25	36	36	N.S	TG	19	38	14	28	N.S
							TT	28	56	25	50	N.S
-590	T	16	16	23	23	N.S	CC	28	56	39	78	0,0213
	C	84	84	77	77	N.S	CT	2	4	0	0	N.S
							TT	20	40	11	22	N.S
-33	T	9	9	25	25	0,0029	CC	41	82	37	74	N.S
	C	91	91	75	75	0,0029	CT	9	18	2	4	0,0172
							TT	0	0	11	22	0,0007
-1098/-590/-33							TTT-TTT	0	0	10	20	0,0012
	TCC	60	60	42	42	0,0117	TCC-TCC	19	38	13	26	N.S
	TTT	9	9	19	19	0,0429	TTT-TCC	3	6	0	0	N.S
	GCC	25	25	33	33	N.S	GCC-GCC	3	6	10	20	0,04
	TCT	0	0	2	2	N.S	GCC-TCC	19	38	13	26	N.S
	TTC	6	6	0	0	0,0139	GTT-GTT	0	0	2	4	N.S
	GTT	0	0	4	4	0,0455	TCT-TCC	0	0	2	4	N.S
							TTC-TTT	6	12	0	0	0,0132
IL-6												
-174	G	56	56	32	32	0,0008	GG	25	50	4	8	<0,0001
	C	44	44	68	68	0,0008	CG	6	12	11	22	N.S
							CC	19	38	35	70	0,0018
Nt565	G	78	78	93	93	0,0029	GG	38	76	47	94	0,0133
	A	22	22	7	7	0,0029	AG	3	6	0	0	N.S
							AA	9	18	3	6	N.S
-174/nt565							GG-GG	19	38	4	8	0,0006
	GG	47	47	15	15	<0,0001	GG-CG	6	12	10	20	N.S
	CA	13	13	7	7	N.S	CG-CG	13	26	32	64	0,0002
	CG	31	31	78	78	<0,0001	CA-CA	6	12	4	8	N.S
	GA	9	9	0	0	0,0025	GG-GA	3	6	0	0	N.S
						GA-GA	3	6	0	0	N.S	
IL-10												
-1082	G	21	21	54	54	<0,0001	GG	13	26	25	50	0,0151
	A	79	79	46	46	<0,0001	AG	3	6	4	8	N.S
							AA	34	68	21	42	0,0104
-819	C	78	78	78	78	N.S	CC	38	76	29	58	N.S
	T	22	22	22	22	N.S	CT	3	6	21	42	0,0001
							TT	9	18	0	0	0,0022
-590	C	78	78	78	78	N.S	CC	38	76	29	58	N.S
	A	22	22	22	22	N.S	CA	3	6	21	42	0,0001
							AA	9	18	0	0	0,0022
-1082/-819/-590							GCC-GCC	13	26	25	50	0,0151
	GCC	28	28	54	54	0,0002	GCC-ACC	3	6	0	0	N.S
	ACC	50	50	25	25	0,0003	GCC-ATA	0	0	4	8	0,0443
	ATA	22	22	21	21	N.S	ACC-ACC	22	44	3	6	<0,0001
							ACC-ATA	3	6	18	36	0,0004
							ATA-ATA	9	18	0	0	0,0022
TGF-β												
codão 10	T	60	60	50	50	N.S	TC	22	44	28	56	N.S
	C	40	40	50	50	N.S	TT	18	36	11	22	N.S
							CC	10	20	11	22	N.S
Codão 25	G	44	44	82	82	<0,0001	CG	6	12	11	22	N.S
	C	56	56	18	18	<0,0001	GG	19	38	35	70	0,0018
							CC	25	50	4	8	<0,0001
Cod10+cod25							TG-TG	0	0	4	8	0,0443
							TG-CC	0	0	4	8	0,0443
	TG	16	16	36	36	0,0015	TG-CG	9	18	21	42	0,0102
	CG	28	28	46	46	0,0090	TG-TC	3	6	7	14	N.S
	CC	12	12	4	4	0,0383	CG-CG	7	14	10	20	N.S
	TC	44	44	14	14	<0,0001	CC-CG	3	6	0	0	N.S
							CC-TC	9	18	0	0	0,0022
							TC-TC	16	32	0	0	<0,0001
						CG-TC	3	6	4	8	N.S	

O haplótipo de elevada produção de IL-4, TCC é mais prevalente em indivíduos com gastrite crónica (60% vs 42%, $p=0,0117$) enquanto que o haplótipo, intermédio, TTT é mais frequente no carcinoma gástrico difuso (19% vs 9%, $p=0,0429$). É de realçar a ausência do haplótipo TTC neste tipo histológico de carcinoma e a ausência do haplótipo GTT nos indivíduos com gastrite crónica (Figura 22E). Nas combinações de haplótipos detectaram-se diferenças significativas para as combinações responsáveis pela diminuição da produção de IL-4 (Tabela 5) ($p < 0,04$). O haplogenótipo GCC-GCC é mais frequente no carcinoma gástrico intestinal (20% vs 6%) enquanto que o haplogenótipo TTC-TTT (0% vs 12%) está ausente neste tipo de cancro e o TTT-TTT ausente na gastrite crónica (0% vs 20%) (Figura 22F).

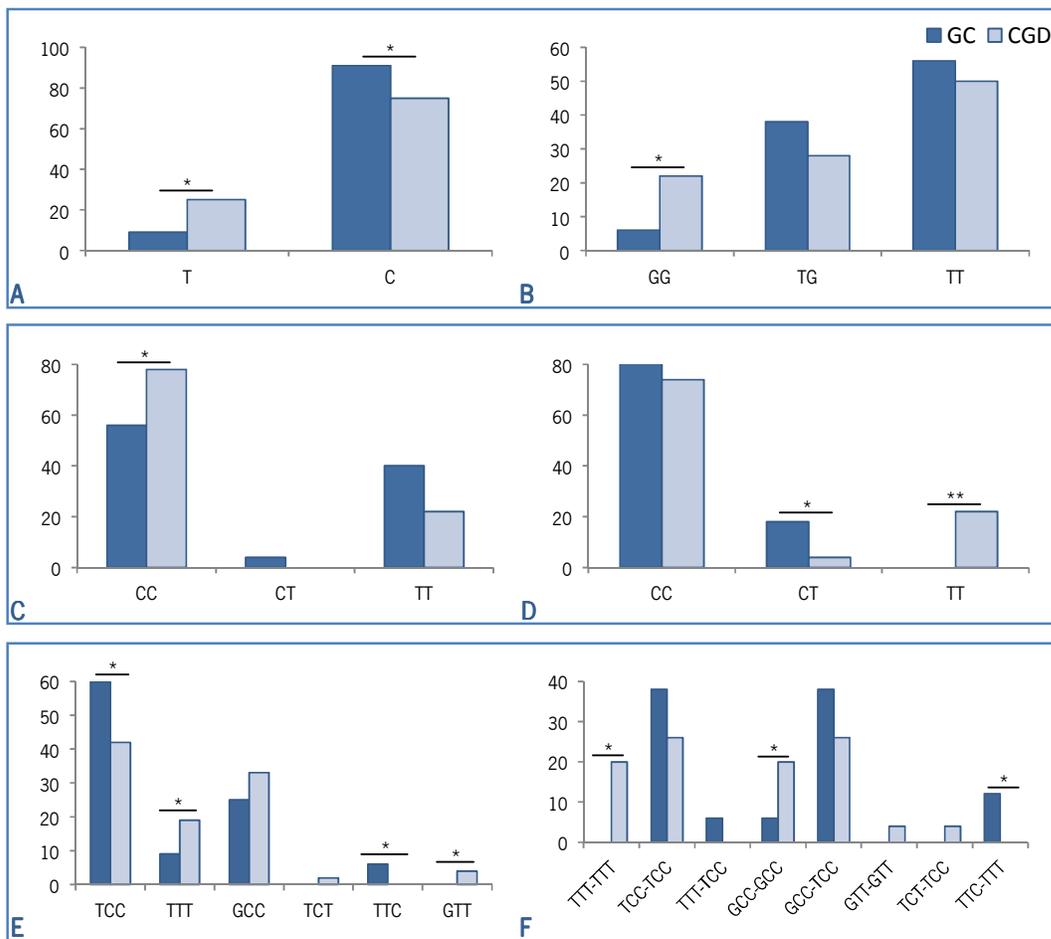


Figura 22 - Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-4 entre indivíduos com GC e CGD. **(A)** Frequências alélicas relativas da posição -33. **(B)** Frequências genóticas relativas da posição -1098, **(C)** posição -590 e **(D)** posição -33. **(E)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos. **(F)** Frequências relativas para as combinações de haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

Na IL-6, foram encontradas diferenças significativas para todas as posições polimórficas (Tabela 5). Na posição polimórfica -174 (G para C) o alelo G e genótipo GG, responsáveis pela elevada produção de IL-6, foram mais frequente na população com gastrite e o alelo C e genótipo CC,

responsáveis pela baixa produção, mais prevalentes na população com carcinoma gástrico difuso, diferenças essas significativas em relação aos dois grupos ($p < 0,0018$) (Figura 23A e 23B). Na posição nt565 da mesma IL, ocorre o inverso. O alelo G, alto produtor, assim como o genótipo GG são mais frequentes nos indivíduos com carcinoma gástrico do tipo difuso enquanto que o alelo A, baixo produtor, é mais prevalente nos indivíduos com gastrite obtendo-se diferenças significativas entre eles ($p \leq 0,01$) (Figura 23C e 23D).

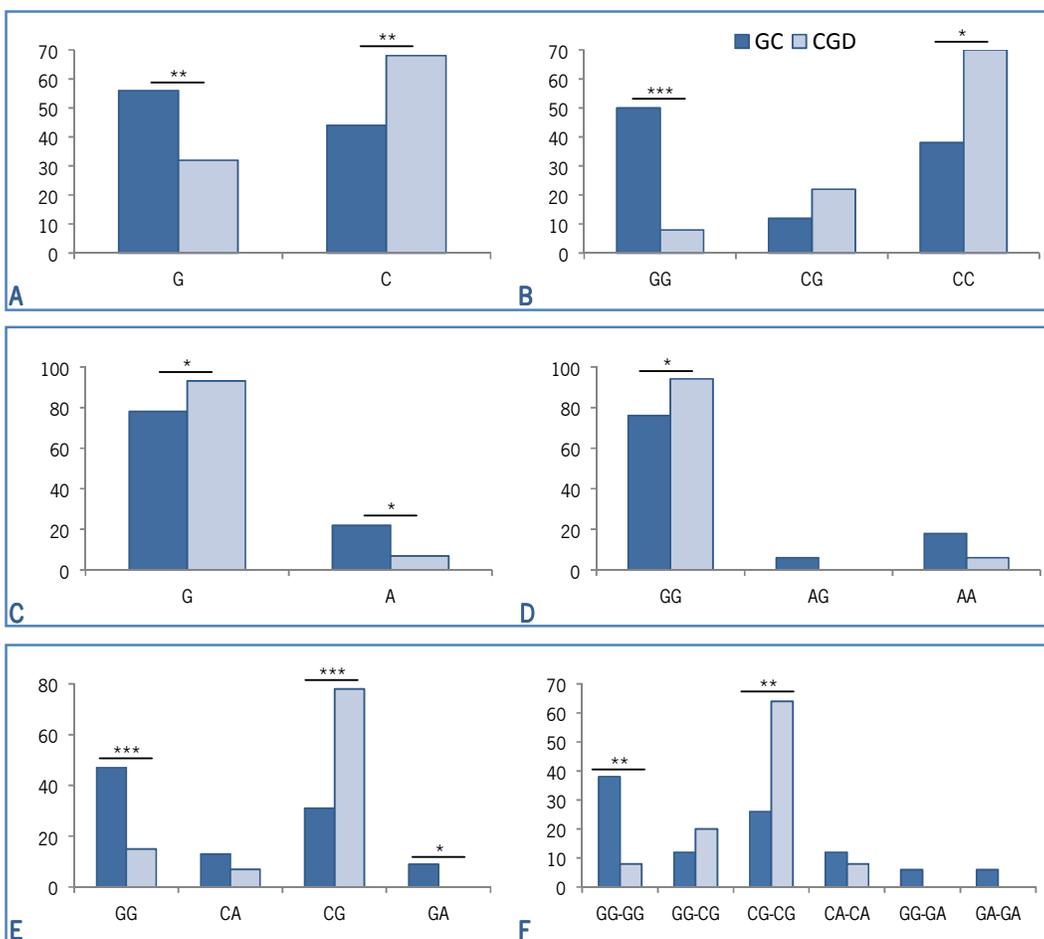


Figura 23 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-6 entre indivíduos com GC e CGD. **(A)** Frequências alélicas e **(B)** genotípicas relativas da posição -174. **(C)** Frequências alélicas e **(D)** genotípicas relativas do nt565. **(E)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos e **(F)** combinações de haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

Na análise de haplótipos (-174/nt565) verificaram-se algumas diferenças significativas ($p = 0,0025$) entre os dois grupos de indivíduos para o haplótipo GA (9% *vs* 0%) e bastante significativas ($p < 0,0001$) para os haplótipos GG (47% *vs* 15%) e CG (31% *vs* 78%) (Figura 23E). Por sua vez, as combinações GG-GG e CG-CG apresentaram diferenças bastante significativas entre o grupo de indivíduos com gastrite crônica e o grupo de indivíduos com carcinoma gástrico do tipo difuso, sendo a combinação GG-GG mais frequente no grupo com gastrite (38% *vs* 8%, $p = 0,0006$) e a

combinação CG-CG mais frequente no grupo com carcinoma gástrico do tipo difuso (64 *vs* 26%, $p=0,0002$) (Figura 23F).

Em relação à IL-10, foram encontradas diferenças com significado estatístico para as frequências alélicas e genóticas para todos os polimorfismos estudados, à exceção das frequências alélicas nas posições -819 e -590 (Tabela 5). Para a posição -1082, foram encontradas diferenças muito significativas ($p < 0,0001$) ao comparar as distribuições alélicas do grupo da gastrite crónica com o grupo do carcinoma gástrico do tipo difuso. Sendo o alelo A, baixo produtor, mais frequente na população com gastrite (79% *vs* 46%) enquanto no grupo com carcinoma gástrico do tipo difuso o alelo G, alto produtor, é o mais prevalente (54% *vs* 21%) (Figura 24A).

Relativamente às frequências genóticas, foram encontradas diferenças significativas ($p \leq 0,02$) para todos os genótipos à exceção dos genótipos -1082AG, -819CC e -590CC (Tabela 5). Os genótipos responsáveis pelo aumento de produção de IL-10 (-1082GG, -819CT e -590CA) são mais prevalentes no carcinoma gástrico difuso, enquanto que os genótipos baixos produtores (-819TT e -590AA) estão ausentes neste grupo. Por outro lado, no grupo de indivíduos com gastrite crónica o genótipo, baixo produtor, -1082AA é o mais frequente comparativamente ao grupo com carcinoma (Figura 24B, 24D e 24E).

Tal como acontece com os genótipos, verificaram-se diferenças significativas para todos os haplótipos ($p \leq 0,0002$), à exceção do -1082/-819/-590ATA (Tabela 5), sendo o haplótipo, de produção intermédia, ACC mais frequente no grupo com gastrite (50% *vs* 25%) e o haplótipo, alto produtor, GCC mais prevalente no outro grupo (54% *vs* 28%) (Figura 24E). As diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$) são também observadas em todas as combinações de haplótipos à exceção da combinação GCC-ACC (Tabela 5). O haplogenótipo associado à elevada produção de IL-10, GCC-GCC, é mais frequente no carcinoma gástrico difuso (50% *vs* 26%) enquanto que o haplogenótipo associado à baixa produção desta IL, ATA-ATA está ausente neste grupo. Por outro lado, no grupo de indivíduos com gastrite crónica, o haplogenótipo ACC-ACC é o mais prevalente (44% *vs* 6%) (Figura 24F).

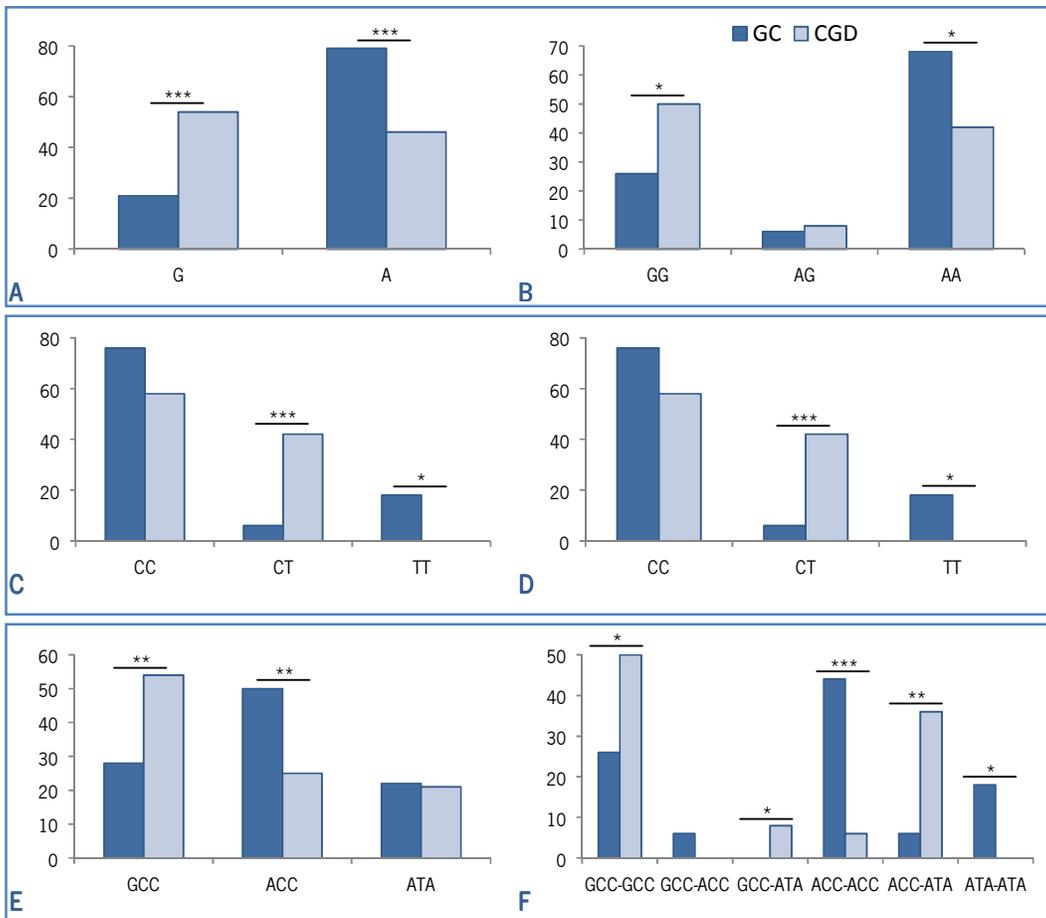


Figura 24 – Comparação das frequências dos polimorfismos da IL-10 entre indivíduos com GC e CGD. **(A)** Frequências alélicas relativas da posição -1082. **(B)** Frequências genotípicas relativas da posição -1082, **(C)** -819 e da **(D)** posição -590. **(E)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos e **(F)** combinações de haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

Para o TGF- β apenas foram encontradas diferenças com significado estatístico para as distribuições alélicas e genotípicas, relativamente às variantes polimórficas presentes no codão 25, ao comparar indivíduos com gastrite crónica e indivíduos com carcinoma gástrico difuso ($p \leq 0,001$) (Tabela 5). O alelo G e o genótipo GG, associados a uma produção/atividade normal do TGF- β , são mais frequentes nos indivíduos com carcinoma gástrico difuso enquanto o alelo C e o genótipo CC, associados a uma produção/atividade diminuída do TGF- β são mais frequentes no grupo com gastrite crónica (Figura 25A e 25B).

Em relação aos haplótipos formados pelas posições cod10/cod25 foram encontradas diferenças com significado estatístico ($p \leq 0,03$) para todos os haplótipos. Os haplótipos TC e CC são mais prevalentes no grupo com gastrite crónica enquanto que os restantes haplótipos, TG e CG, são mais frequentes no grupo com carcinoma gástrico difuso (Figura 25C). Por seu lado, na combinação de haplótipos, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os

dois grupos, à exceção de quatro combinações ($p < 0,0443$). Os haplogenótipos TG-TG e TG-CC estão ausentes nos indivíduos com gastrite crónica enquanto que o haplogenótipo TG-CG é mais prevalente nos indivíduos com carcinoma gástrico difuso. De realçar ainda, a ausência das combinações de haplótipos CC-TC e TC-TC nestes indivíduos (Figura 25D).

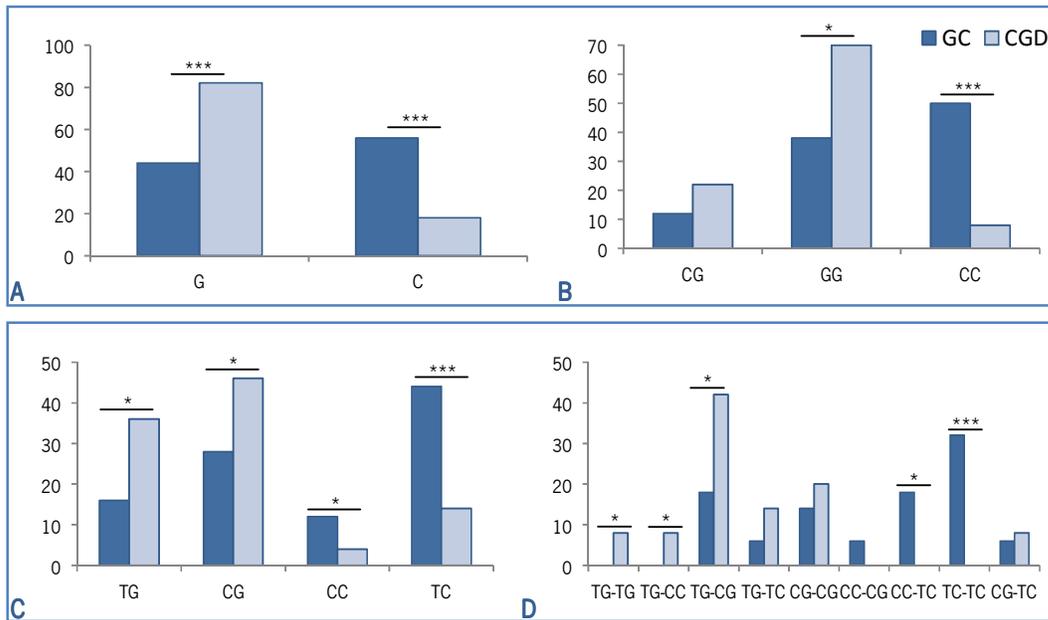


Figura 25 – Comparação das frequências dos polimorfismos do TGF- β entre indivíduos com GC e CGD. **(A)** Frequências alélicas e **(B)** genotípicas relativas do codão 25. **(C)** Frequências relativas para os diferentes haplótipos e **(D)** combinações de haplótipos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0001$).

IV. DISCUSSÃO

4.1. QUALIDADE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Algumas amostras de DNA não apresentaram as condições ideais em relação à pureza e concentração.¹³³ Contudo, o ajuste das suas concentrações aos protocolos de PCR utilizados permitiu minimizar a influência da baixa concentração de DNA na amplificação por PCR. Por outro lado, as elevadas concentrações de proteínas e de degradação, encontradas em algumas amostras, não influenciaram significativamente a obtenção dos dados genéticos por PCR. Assim, podemos considerar que, apesar das baixas concentrações de DNA, das elevadas concentrações de proteínas e da presença de alguma degradação das amostras utilizadas não houve influência na fiabilidade global do estudo.

4.2. POLIMORFISMOS DE CITOCINAS E CARCINOMA GÁSTRICO

O estudo das funções das citocinas e do seu papel no desenvolvimento e progressão do cancro é bastante complexo devido ao pleotropismo e aparente redundância da acção das citocinas.⁵⁷ Aliado a isso, não podemos esquecer o facto da maioria dos estudos serem realizados *in vivo*, onde se torna difícil controlar todas as variantes. Paralelamente, os estudos *in vitro*, apesar de bons indicadores, não permitem reproduzir fielmente os processos que ocorrem no organismo como um todo.³¹ Para além da complexidade relativa às citocinas, também o carcinoma gástrico é uma doença multifatorial e complexa.^{3,19} Apesar de todas estas limitações, neste estudo tentou-se correlacionar alguns polimorfismos de citocinas com o desenvolvimento, propensão e susceptibilidade para o carcinoma gástrico. A presença de distintos alelos em genes polimórficos de citocinas pode contribuir para as diferenças individuais/étnicas no rácio e extensão da produção individual destas proteínas.^{1,6} No final deste trabalho, tornou-se evidente que praticamente todos os polimorfismos analisados influenciam de algum modo a susceptibilidade para a doença. Corroborando a teoria de alguns autores que as citocinas e seus polimorfismos incutem diferentes níveis de risco para o desenvolvimento da carcinogénese em geral, e da gástrica em particular.^{6,87,98,117}

4.2.1. Interleucina-4 e Carcinoma Gástrico

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória com um papel ambíguo na carcinogénese.^{62,105} Enquanto exerce um efeito inibitório em alguns cancros, noutros parece estimulá-los.^{64,105} Para além disto, a sua associação ao carcinoma gástrico permanece duvidosa, enquanto alguns estudos conseguem encontrar associação entre esta IL e o carcinoma gástrico outros estudos contradizem esses efeitos.^{50,60,105,115,127} Desta forma, o impacto dos polimorfismos desta citocina no carcinoma gástrico ainda permanece por esclarecer. A IL-4 tem um papel central na maturação de células Th no fenótipo Th2, com esta mudança de fenótipo, a IL-4 pode aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-13) incluindo, a própria IL-4 e suprimir a produção de monócitos derivados de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e IL-8).⁶⁴ A resposta Th2 representada pela IL-4 é esperada ter um papel protector no desenvolvimento de cancro.⁶⁴ Desta forma, variações genéticas responsáveis pela expressão diferencial de IL-4 e consequentemente pela diferenciação de células Th pode ser crítica na determinação da resposta imune pró ou anti-tumoral. Por outro lado, a activação da via da IL-4 pode levar a uma proliferação celular aumentada, crescimento celular ou apoptose dependendo das vias de transdução de sinal iniciadas.¹³⁵ Neste estudo verificou-se que os polimorfismos da IL-4 parecem influenciar a susceptibilidade à doença gástrica.

4.2.1.1. Interleucina-4 e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal

Face aos resultados obtidos, pode afirmar-se que a presença dos alelos -590T e -33T, do haplótipo TTT e do haplogenótipo TTT-TTT, todos associados à baixa produção de IL-4, encontra-se correlacionada com prevalência de carcinoma gástrico do tipo intestinal. Contrariamente, os alelos -590C e -33C, o genótipo -33CC e o haplogenótipo TCC-TCC, associados à alta produção desta molécula, correlacionam-se com prevalência de gastrite crónica. Resumindo, a alta produção da IL-4 parece ter um efeito protector de carcinoma gástrico do tipo intestinal, enquanto a sua baixa produção parece aumentar o risco de desenvolvimento desta carcinogénese. Como a IL-4 tem um papel central na maturação de células Th no fenótipo Th2, a diminuição da sua produção acarreta uma diminuição da resposta do tipo Th2.^{50,64,66} Esta diminuição pode ser responsável pelo aumento da ruptura de tecidos da mucosa gástrica desencadeada pelas citocinas pro-inflamatórias com posterior desenvolvimento tumoral.⁵⁰ Estes resultados estão de acordo com os previamente descritos por Wu e colaboradores¹²⁶, em 2003, que referem a baixa produção de IL-4 (genótipo -590 TT) como responsável pelo desenvolvimento de carcinoma gástrico e a alta produção (o genótipo -590 CC) como responsável pelo desenvolvimento de úlcera péptica.^{64,126}

4.2.1.2. Interleucina-4 e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso

Tal como esperado, todos os polimorfismos da IL-4 apresentam associação com a susceptibilidade para o desenvolvimento de carcinoma gástrico do tipo difuso. Perante os resultados obtidos neste estudo, pode afirmar-se que a presença das variantes associadas à baixa produção desta citocina, nomeadamente, o alelo -33T, os genótipos -1098GG e -33TT, os haplótipos TTT e GTT, os haplogenótipos TTT-TTT e GCC-GCC, encontra-se correlacionada com a prevalência de carcinoma gástrico do tipo difuso. Paralelamente, o alelo -33C, os genótipos -590CC e -33CT, o haplótipo TCC e o haplogenótipo TCC-TCC, associados à alta produção de IL-4, correlacionam-se com prevalência da gastrite crónica. Resumindo, tal como no carcinoma gástrico intestinal, a alta produção da IL-4 parece ter um efeito protector no carcinoma gástrico difuso, enquanto que a baixa produção desta citocina parece aumentar o risco de desenvolvimento deste tipo histológico. Desta forma, a diminuição da produção de IL-4 conduz ao aumento da ruptura de tecidos da mucosa gástrica e posterior desenvolvimento tumoral, desencadeados pelo aumento da resposta Th1 e pela diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias.^{50,64,66} Embora não existam estudos sobre os polimorfismos da IL-4 que comparem indivíduos com gastrite crónica e com carcinoma gástrico do tipo difuso, estes resultados são contraditórios com estudos anteriores que associam os polimorfismos responsáveis pela elevada produção de IL-4 com a carcinogénese gástrica.^{64,127,131} Contudo, os resultados da IL-4 obtidos neste estudo estão de acordo com os obtidos para o carcinoma gástrico intestinal.^{64,126}

4.2.2. Interleucina-6 e Carcinoma Gástrico

A IL-6 é uma citocina com duplo papel no sistema imune, cujo papel na carcinogénese ainda não está completamente esclarecido.^{68,70,76} A IL-6 é importante ao nível sistémico como uma citocina pró e anti-inflamatória estimulando os fibroblastos e as células epiteliais a secretar a IL1-Ra, provocando a baixa regulação da actividade anti-inflamatória.^{68,69,110} A IL-6 promove o crescimento tumoral inibindo a apoptose das células cancerígenas e induz a angiogénese no tumor.⁶⁸ Elevados níveis de IL-6 são associados com um pior prognóstico no carcinoma gástrico em estádios avançados.^{6,116,130} Tal como a IL-4, a sua associação ao carcinoma gástrico permanece duvidosa com resultados contraditórios.^{128,129} Os polimorfismos na zona promotora da IL-6, principalmente o da posição -174, são de grande interesse porque tem vindo a ser associados com a prevalência, incidência e prognóstico de cancro de uma forma geral.^{69,71,75,76,78,110} Neste estudo verificou-se que os

polimorfismos -174G> C e nt565 G> A da IL-6 demonstraram ter um papel importante na carcinogénese gástrica.

4.2.2.1. Interleucina-6 e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal

Após a análise dos resultados obtidos para a IL-6, pode afirmar-se que a presença do genótipo -174 CG, do haplótipo -174/nt565 CG e do haplogenótipo GG-CG, responsáveis por uma diminuição na produção desta IL, encontra-se associada com prevalência de carcinoma gástrico do tipo intestinal. Por outro lado, o genótipo -174 GG, o haplótipo -174/nt565 GG e do haplogenótipo GG-GG, associados à alta produção desta molécula, correlacionam-se com a prevalência de gastrite crónica. Resumindo, a alta produção de IL-6 parece ter um efeito protector no carcinoma gástrico intestinal, enquanto que a baixa produção desta citocina parece aumentar o risco de desenvolvimento desta patologia. Estes dados são apenas corroborados por Kamangar e colaboradores¹²⁹, em que o genótipo baixo produtor da IL-6, -174CG, tem um risco elevado de carcinoma gástrico.¹²⁹ Deste modo, a diminuição da produção de IL-6 acarreta uma diminuição da actividade anti-tumoral de macrófagos e diminuição da lise de células tumorais.¹³⁶ Por outro lado, como se trata de uma citocina Th3, a diminuição desta molécula pode ainda desencadear um aumento das respostas Th1 e consequente aumento da inflamação e desenvolvimento tumoral.⁶

4.2.2.2. Interleucina-6 e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso

Tal como esperado, todos os polimorfismos da IL-6 apresentam associação com a susceptibilidade para o desenvolvimento de carcinoma gástrico difuso. Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, pode afirmar-se que as variantes de baixa produção de IL-6, nomeadamente, o alelo -174C, o genótipo -174CC, o haplótipo CG e o haplogenótipos CG-CG, encontram-se associadas à prevalência de carcinoma gástrico do tipo difuso (exceptuando-se o caso do alelo nt565 A que apesar de baixo produtor se correlaciona com a gastrite). Contrariamente, o alelo -174G, o genótipo -174GG, os haplótipos GG e GA e o haplogenótipo GG-GG, associados à alta produção da citocina, correlacionam-se com prevalência de gastrite crónica. Resumindo, tal como no carcinoma gástrico intestinal, a alta produção de IL-6 parece ter um efeito protector no carcinoma gástrico difuso, enquanto que a baixa produção desta molécula aumenta o risco de desenvolvimento deste tipo de cancro. Desta forma, a diminuição da produção de IL-6 desencadeia uma diminuição da actividade anti-tumoral de macrófagos e diminuição da lise de células tumorais.¹³⁵ Alternativamente, a sua dupla actividade Th (Th3), leva à diminuição das respostas Th2 e consequente aumento da inflamação e desenvolvimento tumoral.⁶ Estes resultados da IL-6 estão

de acordo com alguns dos resultados previamente descritos e com os obtidos para o carcinoma gástrico intestinal.¹²⁹

4.2.3. Interleucina-10 e Carcinoma Gástrico

Polimorfismos no promotor da IL-10 têm sido referidos como determinantes nas variações inter-individuais na produção de IL-10 e foram associados à susceptibilidade a várias doenças, incluindo o cancro.^{81,82,85,87} A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, que inibe a activação da via Th1, previne a activação de células apresentadoras de antígenos para obter acesso aos antígenos do tumor, e diminui a expressão na superfície de moléculas co-estimuladoras nas células tumorais.^{79,82,84,86} Devido a estas propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias, a IL-10 contribuiu para a evasão das células tumorais da vigilância imune favorecendo o crescimento tumoral.^{82,112,137} Esta molécula pode ainda influenciar a progressão/crescimento de cancro afectando vias não imunes, como a angiogénese, proliferação de células malignas e apoptose celular.¹³⁸ Os resultados obtidos neste trabalho suportam o potencial papel da IL-10 no desenvolvimento de carcinogénese gástrica.

4.2.3.1. Interleucina -10 e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal

Relativamente aos resultados obtidos para a IL-10, verificou-se que a presença do alelo -1082G, do genótipo -1082GG, do haplótipo GCC e do haplogenótipo GCC-GCC, responsáveis pela elevada produção desta molécula, encontra-se associada com prevalência de carcinoma gástrico do tipo intestinal. Paralelamente, o alelo -1082A, o haplótipo ACC e o haplogenótipo ACC-ACC, correlacionados com a diminuição da produção desta IL, aparecem associados à susceptibilidade de gastrite crónica. Resumindo, a alta produção de IL-10 parece ter um efeito desencadeador de carcinoma gástrico intestinal, enquanto a baixa produção desta citocina parece diminuir o risco de desenvolvimento desta doença. Estes resultados são corroborados por vários estudos e, tal como nas IL anteriores, contrariados por outros.^{82,83,126,131} Um estudo liderado por Wu¹²⁶ encontrou associação entre o carcinoma e o haplótipo GCC, para além deste, Liu e colaboradores⁸² encontraram uma forte associação entre o aumento do risco de carcinoma gástrico e o alelo -1082G e o haplótipo GCC.⁸² Esta associação pode ser explicada através do papel imunossupressor da IL-10.^{53,79} Desta forma, o aumento da produção de IL-10 desencadeia a produção de antígenos específicos, como o HLA-G, por parte da célula tumoral despoletando a fuga imune deste tipo histológico.⁸⁸ Esta fuga permite a proliferação intensiva das células carcinogénicas e consequente proliferação tumoral e desenvolvimento de CG.

4.2.3.2. Interleucina-10 e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso

Comparativamente ao carcinoma gástrico do tipo intestinal, os polimorfismos da IL-10 apresentaram associação com a susceptibilidade para o desenvolvimento de carcinoma gástrico do tipo difuso. Tendo em consideração os resultados obtidos neste estudo, pode afirmar-se que as variantes responsáveis por uma elevada produção de IL-10, nomeadamente o alelo -1082G, os genótipos -1082GG, -819CT, -590CA, o haplótipo GCC e os haplogenótipos GCC-GCC e GCC-ATA encontram-se associadas à prevalência de carcinoma gástrico difuso. Contrariamente, o alelo -1082A, os genótipos -1082AA, -819TT e -590AA, o haplótipo ACC, assim como os haplogenótipos ACC-ACC e ATA-ATA, associados à diminuição da produção desta citocina, correlacionam-se com a prevalência de gastrite crónica. Desta forma, a baixa produção da IL-10 parece ter um efeito protector no carcinoma gástrico do tipo difuso, enquanto que a alta produção desta molécula aumenta o risco de desenvolvimento deste tipo de cancro. Esta associação pode dever-se ao papel imunossupressor da IL-10, responsável pelo aumento da expressão de HLA-G e pelo escape imune da célula tumoral.⁸⁸ Apesar de alguns autores referirem associações contrárias às verificadas neste trabalho^{82,87,112,131}, os nossos resultados estão de acordo com as referências que defendem o papel imunossupressor desta citocina no carcinoma gástrico, nomeadamente o trabalho de Lu e colaboradores.¹³⁷

4.2.4. *Transforming Growth Factor-β* e Carcinoma Gástrico

O TGF- β está envolvido em múltiplos processos celulares, desempenhando um duplo papel na génese tumoral.^{6,17,95} Em estadios iniciais o TGF- β actua como um supressor tumoral por inibição da proliferação celular ou promoção da diferenciação celular e apoptose.^{17,96,98} Em estadios avançados, por outro lado, o papel do TGF- β altera para promotor tumoral por estimulação da angiogénese e da motilidade celular, influenciando a resposta imune (do tipo Th3) e levando a invasão progressiva e metástase.^{17,96,98,117} Neste ponto de vista, o TGF- β apresenta-se como um bom candidato para a avaliação do impacto das variações genéticas das citocinas no risco de desenvolvimento de cancro.^{98,117} A produção deste factor é controlada geneticamente por várias mutações com possível significado funcional.¹¹⁷ Nos últimos anos, têm sido descritos vários SNPs, funcionalmente distintos e potenciais influenciadores do risco de carcinoma gástrico.^{96,117} Muitos estudos demonstraram alterações nas vias de sinalização em vários tipos de cancros, sugerindo que a sua sinalização está envolvida na patogénese de carcinoma gástrico, mas o mecanismo molecular pelo qual actua ainda é desconhecido.⁹⁶ Os resultados obtidos neste trabalho suportam

a ideia de que os polimorfismos dos codões 10 e 25 influenciam a susceptibilidade dos diferentes indivíduos para a doença gástrica.

4.2.4.1. *Transforming Growth Factor-β* e Carcinoma Gástrico do tipo Intestinal

Face aos resultados obtidos, verificou-se que a presença do alelo cod25G, do genótipo cod25CG, do haplótipo TG e dos haplogenótipos TG-TG e TG-CG, variações associadas à produção/actividade normal desta citocina, correlaciona-se com prevalência de carcinoma gástrico intestinal. Opostamente, o alelo cod25C, os genótipos cod25CC e cod10CC, o haplótipo TC e os haplogenótipos CG-CG e TC-TC, correlacionados com uma diminuição da produção/actividade do TGF- β , associam-se com a prevalência de gastrite crónica. Resumindo, a baixa produção/actividade deste factor parece ter um efeito protector de carcinoma gástrico do tipo intestinal, enquanto a produção/actividade normal desta citocina parece aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento desta carcinogénese. Como o TGF- β tem um papel importante na proliferação tumoral, nos estadios mais avançados do seu desenvolvimento, a diminuição da produção/actividade deste factor é responsável por uma diminuição no processo proliferativo tumoral e supressão imune.¹⁷ Logo, esta condição diminui o risco de desenvolvimento da carcinogénese gástrica intestinal. Estes resultados, apesar de não apresentarem estudos concordantes em termos do impacto das suas variações genéticas, vão ao encontro dos resultados apresentados por vários autores que associam níveis baixos de TGF- β na circulação com a ausência de carcinoma gástrico.^{96,139}

4.2.4.2. *Transforming Growth Factor-β* e Carcinoma Gástrico do tipo Difuso

Neste estudo verificou-se que a presença das variantes associadas à produção/actividade normal desta citocina, nomeadamente, o alelo cod25G, o genótipo cod25GG, os haplótipos TG e CG e o haplogenótipo TG-TG, aparecem correlacionados com prevalência de carcinoma gástrico difuso. Paralelamente, o alelo cod25C, o genótipo cod25CC, o haplótipo TC e os haplogenótipos CC-TC e TC-TC, vulgarmente correlacionados com uma diminuição da produção/actividade do TGF- β , associam-se com a prevalência de gastrite crónica. Em suma, tal como verificado no carcinoma gástrico do tipo intestinal, a baixa produção/actividade deste factor parece ter um efeito protector no carcinoma gástrico do tipo difuso. Por outro lado, a produção/actividade normal desta citocina parece aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento desta carcinogénese. Da mesma forma, o papel proliferativo do TGF- β nos estadios mais avançados do desenvolvimento tumoral, sugerem que a diminuição da produção/actividade deste factor é responsável por uma diminuição

na proliferação tumoral e supressão imune.¹⁷ Portanto, esta conjuntura diminui o risco de desenvolvimento de carcinogénese gástrica difusa e intestinal. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para o carcinoma gástrico do tipo intestinal e com os estudos referentes aos níveis séricos desta molécula no carcinoma gástrico.^{96,139}

V. CONCLUSÃO

As citocinas Th2 e Th3 analisadas parecem ter um papel importante no processo de desenvolvimento e progressão de carcinoma gástrico, podendo tornar os indivíduos mais ou menos susceptíveis a este tipo de patologia. Embora alguns destes resultados ainda não tenham sido descritos, a sua descoberta levanta questões importantes sobre a actividade das citocinas na génese da doença gástrica. Provavelmente, o polimorfismo genético destas citocinas, directamente ligado ao seu nível de expressão, influencia a progressão do mecanismo tumoral. Será, portanto, pertinente estudar mais profundamente o envolvimento destes polimorfismos na patologia molecular desta doença.

Na doença gástrica, além da infecção por HP, deve-se ter em conta o polimorfismo das citocinas do hospedeiro, dado que o presente estudo demonstrou que estes polimorfismos influenciam directamente a propensão para a doença gástrica. Deste modo, os polimorfismos da IL-4 e IL-6 associados à sua elevada produção parecem ter um efeito protector individual de carcinoma gástrico. Enquanto, a baixa produção destas IL parece aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento desta carcinogénese. Contrariamente, os polimorfismos de alta expressão/actividade da IL-10 e do TGF-B aparecem associados à maior susceptibilidade para a doença. Por outro lado, os polimorfismos de baixa expressão/actividade destas citocinas correlacionam-se com a protecção individual para a doença.

Por conseguinte, a possibilidade de determinação de riscos individuais de desenvolvimento de carcinoma gástrico e de gastrites crónicas pode constituir uma ferramenta importante para a prevenção destas doenças. Este facto assume particular importância em países, como Portugal, com elevadas taxas de doenças gástricas. Com este trabalho, tornou-se evidente que a análise dos polimorfismos de citocinas é de extrema importância para o acompanhamento familiar de pacientes, bem como, para a análise geral de risco dos restantes indivíduos na população. Esta análise permitiria direccionar intervenções com objectivos preventivos, principalmente para indivíduos com um risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma gástrico.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: what is new? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(8):1865-68.
2. Khan FA, Shukla AN. Pathogenesis and treatment of gastric carcinoma: "an up-date with brief review". *J Cancer Res Ther.* 2006; 2(4):196-99.
3. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(3):354-62.
4. Sasako M, Inoue M, Lin JT, Khor C, Yang HK, Ohtsu A. Gastric Cancer Working Group report. *Jpn J Clin Oncol.* 2010; 40(1):28-37.
5. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. (<http://www.iarc.fr/>), acedido em Setembro 2011.
6. Mahajan R, El-Omar EM, Lissowska J, Grillo P, Rabkin CS, Baccarelli A, *et al.* Genetic variants in T helper cell type 1, 2 and 3 pathways and gastric cancer risk in a Polish population. *Jpn J Clin Oncol.* 2008; 38(9):626-33.
7. Nobili S, Bruno L, Landini I, Napoli C, Bechi P, Tonelli F, *et al.* Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(3):290-9.
8. Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, Hirata R Jr, Pelosof A, Gomes LI, *et al.* Molecular classifiers for gastric cancer and non malignant diseases of the gastric mucosa. *Cancer Res.* 2004; 64(4):1255-65.
9. Tepes B. Can gastric cancer be prevented? *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60(7):71-7.
10. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965; 64:31-49.
11. Fuentes-Pananá E, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C. Infection, inflammation and gastric cancer. *Salud Publica Mex.* 2009; 51(5):427-33.
12. Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2008; 26(17):2876-82.

13. Sezeur A, Schielke A, Larue L, Fléjou JF. Hereditary diffuse gastric cancer. *Gastroenterol Clin Biol.* 2006; 30(10):1205-13.
14. Cisco RM, Ford JM, Norton JA. Hereditary diffuse gastric cancer: implications of genetic testing for screening and prophylactic surgery. *Cancer.* 2008; 113(7):1850-6.
15. Van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Tiebosch AT, Homan M, Beuving A, Jansen PL, *et al.* Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. *J Clin Pathol.* 2003; 56(9):699-702.
16. Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, Offerhaus GJ. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. *Hum Genet.* 2009; 126(5):615-28.
17. Komuro A, Yashiro M, Iwata C, Morishita Y, Johansson E, Matsumoto Y, *et al.* Diffuse-type gastric carcinoma: progression, angiogenesis, and transforming growth factor beta signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(8):592-604.
18. Kim B, Bang S, Lee S, Kim S, Jung Y, Lee C, *et al.* Expression profiling and subtype-specific expression of stomach cancer. *Cancer Res.* 2003; 63(23):8248-55.
19. Milne AN, Offerhaus GJ. Early-onset gastric cancer: Learning lessons from the young. *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(2):59-64.
20. Takayama S, Wakasugi T, Funahashi H, Takeyama H. Strategies for gastric cancer in the modern era. *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(9):335-41.
21. Fuccio L, Eusebi LH, Bazzoli F. Gastric cancer, *Helicobacter pylori* infection and other risk factors. *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(9):342-7.
22. Rocco A, Nardone G. Diet, *H pylori* infection and gastric cancer: evidence and controversies. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(21):2901-12.
23. 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.
24. Kikuchi S. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2002; 5:6-15.
25. Pandey R, Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Kumar A, Tiwari BK. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2010; 11(3):583-8.
26. Shiota S, Yamaoka Y. Management of *Helicobacter pylori*. *F1000 Med Rep.* 2010; 2:20.
27. Genta RM, Rugge M. Assessing risks for gastric cancer: new tools for pathologists. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:5622-7.

28. Nardone G, Rocco A, Malfertheiner P. Review article: helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20(3):261-70.
29. Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Hamajima N. Genetic predisposition to Helicobacter pylori-induced gastric precancerous conditions. *World J Gastrointest Oncol.* 2010; 2(10):369-79.
30. Polk DB, Peek RM Jr. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(6):403-14.
31. Ognjanovic S, Yuan JM, Chaptman AK, Fan Y, Yu MC. Genetic polymorphisms in the cytokine genes and risk of hepatocellular carcinoma in low-risk non-Asians of USA. *Carcinogenesis.* 2009; 30(5):758-62.
32. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:2979-90.
33. Dorer MS, Talarico S, Salama NR. Helicobacter pylori's unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10):e1000544.
34. Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto. Causal role of Helicobacter pylori infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:181-6.
35. Tan VP, Wong BC. Helicobacter pylori and gastritis: Untangling a complex relationship 27 years on. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26(1):42-5.
36. Prinz C, Schwendy S, Voland P. H pylori and gastric cancer: shifting the global burden. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(34):5458-64.
37. Peek RM Jr, Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in Helicobacter pylori-induced gastric malignancy. *Physiol Rev.* 2010; 90(3):831-58.
38. Mbulaiteye SM, Hisada M, El-Omar EM. Helicobacter Pylori associated global gastric cancer burden. *Front Biosci.* 2009; 14:1490-504.
39. Kamangar F, Sheikhattari P, Mohebtash M. Helicobacter pylori and its Effects on Human Health and Disease. *Arch Iran Med.* 2011; 14(3):192-9.
40. Con SA, Takeuchi H, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Yasuda N, Con-Wong R. Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(2):211-8.
41. Murakami K, Kodama M, Fujioka T. Latest insights into the effects of Helicobacter pylori infection on gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(17):2713-20.
42. Sampaio A, Santos P. Factores genéticos do Helicobacter pylori e do hospedeiro na carcinogénese gástrica. *Rev. Port. Ciências biomédicas.* 2008; III (3):72-8.

43. Zhu F, Loh M, Hill J, Lee S, Koh KX, Lai KW, *et al*. Genetic factors associated with intestinal metaplasia in a high risk Singapore-Chinese population: a cohort study. *BMC Gastroenterol*. 2009; 9:76.
44. Perri F, Terracciano F, Gentile M, Merla A, Scimeca D, Zullo A. Role of interleukin polymorphisms in gastric cancer: "Pros and cons". *World J Gastrointest Oncol*. 2010; 2(6):265-71.
45. Yin M, Hu Z, Tan D, Ajani JA, Wei Q. Molecular epidemiology of genetic susceptibility to gastric cancer: focus on single nucleotide polymorphisms in gastric carcinogenesis. *Am J Transl Res*. 2009; 1(1):44-54.
46. Yasui W, Sentani K, Motoshita J, Nakayama H. Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scand J Surg*. 2006; 95(4):225-31.
47. Peleteiro B, Lunet N, Carrilho C, Durães C, Machado JC, La Vecchia C, *et al* Association between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions: systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19(3):762-76.
48. Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. *J Nutr*. 2007; 137(1):194S-199S.
49. Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2011; 3:3856-93.
50. Kesarwani P, Ahirwar D, Singh R, Manchanda PK, Mittal RD. Do IL-4 intron 3 VNTR and IL-6 (-174) G/C variants reflect ethnic variation? A comparative study between the global and North Indian populations. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008; 9(1):76-80.
51. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2):S53-72.
52. Aggarwal B. B., Puri R. K. (1995). *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy*. Blackwell Science. Cambridge, UK.
53. Lynch EL, Little FF, Wilson KC, Center DM, Cruikshank WW. Immunomodulatory cytokines in asthmatic inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; 14(6):489-502.
54. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T. *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis. *J Physiol Pharmacol*. 2009; 60(3):3-21.
55. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2001). *Immunobiology*. 5th Edition. Garland Publishing, New York, USA.
56. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13(4-5):413-21.

57. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(11):887-99.
58. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(1):11-22.
59. Minguela A, Torio A, Marin L, Sanchez-Bueno F, Garcia-Alonso AM, Ontanon J, *et al*. Implication of Th1, Th2, and Th3 cytokines in liver graft acceptance. *Transplantation Proceedings*. 1999; 31:519–20.
60. Sosna O, Kolesár L, Slavčev A, Skibová J, Fait T, Mara M, *et al*. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid. *Folia Biol (Praha)*. 2010; 56(5):206-10.
61. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF- α Gene Polymorphism: Clinical and Biological Implications. *Microscopy Research and Technique*; 2000; 50:216-28.
62. Yannopoulos A, Nikiteas N, Chatzitheofylaktou A, Tsigris C. The (-590 C/T) polymorphism in the interleukin-4 gene is associated with increased risk for early stages of colorectal adenocarcinoma. *In Vivo*. 2007; 21(6):1031-5.
63. Protein Data Bank. (<http://www.rcsb.org/>), acedido em Dezembro 2011
64. Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(10):1188-200.
65. Hwang ES, White IA, Ho IC. An IL-4-independent and CD25-mediated function of c-maf in promoting the production of Th2 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(20):13026-30.
66. Huang LR, Chen FL, Chen YT, Lin YM, Kung JT. Potent induction of long-term CD8+ T cell memory by short-term IL-4 exposure during T cell receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(7):3406-11.
67. Gu F, Qureshi AA, Niu T, Kraft P, Guo Q, Hunter DJ, *et al*. Interleukin and interleukin receptor gene polymorphisms and susceptibility to melanoma. *Melanoma Res*. 2008; 18(5):330-5.
68. Łukaszewicz M, Mroczko B, Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. *Pol Arch Med Wewn*. 2007; 117(5-6):247-51.
69. Vishnoi M, Pandey SN, Choudhury G, Kumar A, Modi DR, Mittal B. Do TNFA -308 G/A and IL6 -174 G/C gene polymorphisms modulate risk of gallbladder cancer in the north Indian population?. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2007; 8(4):567-72.

70. Duch CR, Figueiredo MS, Ribas C, Almeida MS, Colleoni GW, Bordin JO. Analysis of polymorphism at site -174 G/C of interleukin-6 promoter region in multiple myeloma. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(2):265-7.
71. Bennermo M, Held C, Stemme S, Ericsson CG, Silveira A, Green F, *et al.* Genetic predisposition of the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases? *Clin Chem.* 2004; 50(11):2136-40.
72. Bethin KE, Vogt SK, Muglia LJ. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(16):9317-22.
73. Choi SE, Choi KM, Yoon IH, Shin JY, Kim JS, Park WY, *et al.* IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immunol.* 2004; 13(1):43-53.
74. Reyes-Gibby CC, Spitz M, Wu X, Merriman K, Etzel C, Bruera E, *et al.* Cytokine genes and pain severity in lung cancer: exploring the influence of TNF-alpha-308 G/A IL6-174G/C and IL8-251T/A. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(12):2745-51.
75. Hefler LA, Grimm C, Lantzsch T, Lampe D, Leodolter S, Koelbl H, *et al.* Interleukin-1 and interleukin-6 gene polymorphisms and the risk of breast cancer in caucasian women. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(16):5718-21.
76. Liao WC, Lin JT, Wu CY, Huang SP, Lin MT, Wu AS, *et al.* Serum interleukin-6 level but not genotype predicts survival after resection in stages II and III gastric carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(2):428-34.
77. Slattery ML, Wolff RK, Herrick JS, Caan BJ, Potter JD. IL6 genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2007; 18(10):1095-105.
78. Garg R, Wollan M, Galic V, Garcia R, Goff BA, Gray HJ, *et al.* Common polymorphism in interleukin 6 influences survival of women with ovarian and peritoneal carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2006; 103(3):793-6.
79. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 2003; 55(2):241-69.
80. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15(1):61-76.

81. Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A, Martini M, Massini G, Vannata B, *et al.* Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2007; 18(8):1376-81.
82. Liu J, Song B, Wang JL, Li ZJ, Li WH, Wang ZH. Polymorphisms of interleukin-10 promoter are not associated with prognosis of advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(10):1362-7.
83. Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Felekouras E, Nikiteas N, Karakitsos P, Panoussopoulos D, *et al.* Relation between common polymorphisms in genes related to inflammatory response and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(31):5037-43.
84. Löhning M, Richter A, Stamm T, Hu-Li J, Assenmacher M, Paul WE, *et al.* Establishment of memory for IL-10 expression in developing T helper 2 cells requires repetitive IL-4 costimulation and does not impair proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(21):12307-12.
85. Wu MS, Huang SP, Chang YT, Shun CT, Chang MC, Lin MT, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter polymorphisms in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Infect Dis.* 2002; 185(1):106-109.
86. Szkaradkiewicz A, Karpiński TM, Drews M, Borejsza-Wysocki M, Majewski P, Andrzejewska E. Natural killer cell cytotoxicity and immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta1) in patients with gastric cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:901564.
87. 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(8):1869-73.
88. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol.* 2001; 22(10):553-5.
89. Laouini D, Alenius H, Bryce P, Oettgen H, Tsitsikov E, Geha RS. IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest.* 2003; 112(7):1058-66.
90. Unsicker K, Kriegstein K. Co-activation of TGF-ss and cytokine signaling pathways are required for neurotrophic functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11(1-2):97-102.
91. Yoshinaga K, Obata H, Jurukovski V, Mazziere R, Chen Y, Zilberberg L, *et al.* Perturbation of transforming growth factor (TGF)-beta1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(48):18758-63.

92. Lv ZD, Na D, Liu FN, Du ZM, Sun Z, Li Z, *et al.* Induction of gastric cancer cell adhesion through transforming growth factor-beta1-mediated peritoneal fibrosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010; 29:139.
93. Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor beta. *Adv Cancer Res.* 1988; 51:107-45.
94. Du C, Wang Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30:12.
95. Hawinkels LJ, Verspaget HW, van Duijn W, van der Zon JM, Zuidwijk K, Kubben FJ, *et al.* Tissue level, activation and cellular localisation of TGF-beta1 and association with survival in gastric cancer patients. *Br J Cancer.* 2007; 97(3):398-404.
96. Hong S, Lee HJ, Kim SJ, Hahm KB. Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: focus on TGF-beta signaling. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(17):2080-93.
97. Jo Y, Han SU, Kim YJ, Kim JH, Kim ST, Kim SJ, *et al.* Suppressed Gastric Mucosal TGF-beta1 Increases Susceptibility to *H. pylori*-Induced Gastric Inflammation and Ulceration: A Stupid Host Defense Response. *Gut Liver.* 2010; 4(1):43-53.
98. Guan X, Zhao H, Niu J, Tan D, Ajani JA, Wei Q. Polymorphisms of TGFB1 and VEGF genes and survival of patients with gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28:94.
99. Wu MS, Lin JT, Hsu PN, Lin CY, Hsieh YT, Chiu YH, *et al.* Preferential induction of transforming growth factor-beta production in gastric epithelial cells and monocytes by *Helicobacter pylori* soluble proteins. *J Infect Dis.* 2007; 196(9):1386-93.
100. Kirkley SA. Proposed mechanisms of transfusion-induced. Immunomodulation. *Clin Diagn Lab Immun.* 1999; 6: 652-57.
101. Kushner I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9(3-4):191-6.
102. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2001; 166(6):3915-22.
103. Awad MR, Webber S, Boyle G, Sturchio C, Ahmed M, Martell J, *et al.* The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant.* 2001; 20(6):625-30.

104. Poole KL, Gibbs PJ, Evans PR, Sadek SA, Howell WM. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transpl Immunol.* 2001; 8(4):259-65.
105. Reynard MP, Turner D, Navarrete CV. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. *Eur J Immunogenet.* 2000; 27(4):241-9.
106. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* 1999; 1(1):3-19.
107. Pravica V, Brogan IJ, Hutchinson IV. Rare polymorphisms in the promoter regions of the human interleukin-12 p35 and interleukin-12 p40 subunit genes. *Eur J Immunogenet.* 2000; 27(1):35-6.
108. Ubaldi de Capei MU, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtioni ES. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *Eur J Immunogenet.* 2003; 30(1):5-10.
109. Holweg CT, Peeters AM, Balk AH, Uitterlinden AG, Niesters HG, Maat AP, *et al.* Recipient gene polymorphisms in the Th-1 cytokines IL-2 and IFN-gamma in relation to acute rejection and graft vascular disease after clinical heart transplantation. *Transpl Immunol.* 2003; 11(1):121-7.
110. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, *et al.* Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFkB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2003; 63(13):3560-6.
111. Selgrad M, Malfertheiner P, Fini L, Goel A, Boland CR, Ricciardiello L. The role of viral and bacterial pathogens in gastrointestinal cancer. *J Cell Physiol.* 2008; 216(2):378-88.
112. 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(8):1082-9.
113. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997; 24(1):1-8.
114. Shrestha S, Wang C, Aissani B, Wilson CM, Tang J, Kaslow RA. Interleukin-10 gene (IL10) polymorphisms and human papillomavirus clearance among immunosuppressed adolescents. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(8):1626-32.

115. Ko KP, Park SK, Cho LY, Gwack J, Yang JJ, Shin A, *et al.* Soybean product intake modifies the association between interleukin-10 genetic polymorphisms and gastric cancer risk. *J Nutr.* 2009; 139(5):1008-12.
116. Savage SA, Abnet CC, Haque K, Mark SD, Qiao YL, Dong ZW, *et al.* 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.* 2004; 13(9):1547-9.
117. Zhang P, Di JZ, Zhu ZZ, Wu HM, Wang Y, Zhu G, *et al.* Association of transforming growth factor-beta 1 polymorphisms with genetic susceptibility to TNM stage I or II gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2008; 38(12):861-6.
118. Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286(4):G515-20.
119. Wu Y, Zhou BP. Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle.* 2009; 8(20):3267-73.
120. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454(7203):436-44.
121. Grivennikov SI, Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev.* 2010; 20(1):65-71.
122. Germano G, Allavena P, Mantovani A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine.* 2008; 43(3):374-9.
123. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, *et al.* Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology.* 2009; 214(9-10):761-77.
124. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140(6):883-99.
125. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117(5):1175-83.
126. Wu MS, Wu CY, Chen CJ, Lin MT, Shun CT, Lin JT. Interleukin- 10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int J Cancer* 2003; 104:617-623.
127. Lai KC, Chen WC, Jeng LB, Li SY, Chou MC, Tsai FJ. Association of genetic polymorphisms of MK, IL-4, p16, p21, p53 genes and human gastric cancer in Taiwan. *Eur J Surg Oncol.* 2005; 31:1135-1140.

128. Gatti LL, Burbano RR, Zambaldi-Tunes M, de-Lábio RW, de Assumpção PP, de Arruda Cardoso-Smith M, *et al.* Interleukin-6 polymorphisms, Helicobacter pylori infection in adult Brazilian patients with chronic gastritis and gastric adenocarcinoma. Arch Med Res. 2007; 38(5):551-5.
129. Kamangar F, Abnet CC, Hutchinson AA, Newschaffer CJ, Helzlsouer K, Shugart YY, *et al.* Polymorphisms in inflammation-related genes and risk of gastric cancer (Finland). Cancer Causes Control. 2006; 17(1):117-25.
130. Wallner G, Ciechański A, Dąbrowski A. Serum level of the angiogenetic factors: IL-6 and IL-8 in patients with gastric cancer. Asian J. Surg. 2002; 26:132.
131. 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(5):1193-201.
132. QIAGEN, Sample & Assay Technologies. (<http://www.qiagen.com/products/>), acedido em Setembro 2011.
133. Sambrook J, Russel DW. (2001). Molecular cloning - A laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. USA.
134. Invitrogen. (<http://products.invitrogen.com/>), acedido em Setembro 2011.
135. Tindall EA, Severi G, Hoang HN, Ma CS, Fernandez P, Southey MC, Comprehensive analysis of the cytokine-rich chromosome 5q31.1 region suggests a role for IL-4 gene variants in prostate cancer risk. Carcinogenesis. 2010; 31(10):1748-54.
136. Slattery ML, Curtin K, Sweeney C, Wolff RK, Baumgartner RN, Baumgartner KB, *et al.* Modifying effects of IL-6 polymorphisms on body size-associated breast cancer risk. Obesity (Silver Spring). 2008; 16(2):339-47.
137. Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor {alpha} and risk of gastric cancer in a Chinese population. Carcinogenesis. 2005; 26(3):631-6.
138. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. J Leukoc Biol. 2005; 78(5):1043-51.
139. Li X, Yue ZC, Zhang YY, Bai J, Meng XN, Geng JS, *et al.* Elevated serum level and gene polymorphisms of TGF-beta1 in gastric cancer. J Clin Lab Anal. 2008; 22(3):164-71.