

FABRÍCIO FREIRE DE MELO

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS BEM COMO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE *H.*
pylori NAS CONCENTRAÇÕES GÁSTRICAS DAS CITOCINAS EM CRIANÇAS E
ADULTOS**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

2007

FABRÍCIO FREIRE DE MELO

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS
PRÓ-INFLAMATÓRIAS BEM COMO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE *H.*
pylori NAS CONCENTRAÇÕES GÁSTRICAS DAS CITOCINAS EM CRIANÇAS
ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

Orientadora: Prof^ª. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Co-orientadora: Prof^ª. Andreia Maria Camargos Rocha

Departamento de Microbiologia/Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia/faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE

2007

DEDICATÓRIA

Ao meu primo Yuri;

Aos companheiros do LPB;

Aos meus pais, ao meu irmão, ao Daniel, aos meus familiares e amigos;

Aos que estiveram presente em cada etapa desse trabalho;

Aos pacientes, razão desse estudo.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. Portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma estiveram presente neste estudo, em especial:

À minha orientadora Prof^a. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz.

À minha co-orientadora Prof^a. Andreia Maria Camargos Rocha.

Ao Prof. Gifone de Aguiar Rocha.

À Prof^a. Taciana de Figueiredo Soares.

À Dr^a. Luciana Ignácia Gomes.

À Dr^a. Juliana Becattini Guerra.

À Prof^a. Silvia Beleza de Moura.

Aos colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia.

Aos funcionários, bolsistas de Apoio Técnico e de Iniciação Científica do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia.

À Marina, à Débora e ao Sérgio.

Aos médicos Paulo Bittencourt, Edivaldo Moreira e Anfrisina Carvalho e aos funcionários do Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas/UFMG, do Hospital Felício Rocho e do Centro Geral de Pediatria.

Aos médicos e funcionários do Serviço de Gastroenterologia do IPSEMG.

Ao Dr. Celso Affonso de Oliveira.

À Prof^a. Erna Geesien Kroon, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

Ao corpo docente do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

Ao Douglas, funcionário do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológica/UFMG.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos.

Aos meus familiares.

Ao Daniel.

Ao meu irmão.

Aos meus pais.

Aos pacientes que generosamente aceitaram participar desse estudo tornando possível a sua concretização.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A infecção pelo <i>H. pylori</i>	1
1.2. Fatores de virulência do <i>H. pylori</i>	2
1.3. Fatores relacionados ao hospedeiro.....	4
1.4. Infecção pelo <i>H. pylori</i> e níveis gástricos de citocinas.....	6
1.5. Efeitos de polimorfismos dos genes <i>IL1B</i> , <i>IL1RN</i> e <i>TNFA</i> nos níveis de citocinas na mucosa gástrica de pacientes com infecção pelo <i>H. pylori</i>	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	11
3.1. Pacientes.....	11
3.2. Colheita de fragmentos de mucosa gástrica e amostras de sangue.....	12
3.3. Isolamento, identificação e manutenção das amostras de <i>H. pylori</i>	12
3.4. Extração do DNA das amostras de <i>H. pylori</i>	13
3.4.1. Amplificação dos genes DNAr 16S e ureA específicos de <i>H. pylori</i>	14
3.4.2. Pesquisa dos fatores de virulência do <i>H. pylori</i>	14
3.5. Teste da uresase pré-formada.....	15
3.6. Critérios de positividade para <i>H. pylori</i>	15
3.7. Extração do DNA de leucócitos e avaliação da presença de polimorfismos nos genes que codificam citocinas.....	15
3.7.1. Extração do DNA.....	15
3.7.2. Pesquisa da presença de polimorfismos nos genes que codificam citocinas.....	17
3.7.3. Seqüenciamento para confirmação dos resultados	21
3.8. Extração de proteínas dos fragmentos de mucosa gástrica.....	21

3.9.	Dosagem de proteína total.....	21
3.10.	Determinação da concentração de citocinas na mucosa gástrica.....	22
3.11.	Análise estatística.....	23
4.	RESULTADOS.....	30
4.1.	População.....	30
4.2.	Detecção dos genes de virulência do <i>H. pylori</i>	31
4.2.1.	<i>cagA</i>	31
4.2.2.	<i>vacA</i>	31
4.3.	Polimorfismos nos genes que codificam citocinas.....	32
4.4.	Níveis de citocinas na mucosa gástrica de crianças e adultos <i>H. pylori</i> - negativos e -positivos.....	34
4.4.1.	Comparação entre os níveis de citocinas na mucosa gástrica de crianças e adultos.....	39
4.5.	Níveis de citocinas na mucosa gástrica de crianças e adultos colonizados por amostras <i>cagA</i> -positivas ou -negativas.....	42
4.6.	Níveis de citocinas na mucosa gástrica de crianças e adultos colonizados por amostras com diferentes genótipos de <i>vacA</i>	44
4.7.	Polimorfismos nos genes que codificam citocinas e concentração gástrica de citocinas.....	48
4.7.1.	Pacientes <i>H. pylori</i> -negativos.....	48
4.7.1.1	<i>IL1B</i> -31.....	48
4.7.1.2	<i>IL1RN</i>	48
4.7.1.3	<i>TNFA</i>	49
4.7.2.	Pacientes <i>H. pylori</i> -positivos.....	49
4.7.2.1	<i>IL1B</i> -31.....	49
4.7.2.2	<i>IL1RN</i>	50
4.7.2.2	<i>TNFA</i>	51
5.	DISCUSSÃO.....	52
6.	RESUMO E CONCLUSÕES.....	58

7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8.	REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS	71
9.	ANEXO	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Iniciadores e condições das reações de PCR para detecção de <i>ureA</i> , <i>DNAr 16S</i> , <i>cagA</i> e mosaïcismo de <i>vacA</i>	28
Tabela 2-	Iniciadores e condições das reações de PCR para detecção de polimorfismos de <i>IL1B</i> na posição -31 e -511, <i>IL1RN-VNTR</i> e <i>TNFA</i> na posição -307.....	29
Tabela 3-	Características da população estudada.....	30
Tabela 4-	Genótipos de <i>vacA</i> nas amostras de <i>H. pylori</i> isoladas de crianças e adultos.....	32
Tabela 5-	Frequência dos genótipos de <i>IL1B</i> -31 e -511, <i>IL1RN VNTR</i> e <i>TNFA</i> -307 em crianças e adultos <i>H. pylori</i> -negativos e <i>H. pylori</i> -positivos.....	33
Tabela 6-	Níveis médios de IL-1 β , IL- α 1, IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de crianças <i>H. pylori</i> -negativas e -positivas.....	35
Tabela 7-	Níveis médios de IL-1 β , IL- α 1, IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de adultos <i>H. pylori</i> -negativos e -positivos.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Gel de agarose dos produtos amplificados do gene <i>IL1B</i> na posição -511(PCR-RFLP).....	17
Figura 2-	Gel de agarose dos produtos amplificados do gene <i>IL1B</i> na posição -31 (PCR-CTPP).....	18
Figura 3-	Gel de agarose dos produtos amplificados do gene <i>IL1RN</i> (PCR).....	19
Figura 4-	Gel de acrilamida dos produtos amplificados do gene <i>TNFA</i> (PCR-RFLP)..	20
Figura 5-	Concentração de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de crianças HP- (<i>H. pylori</i> -negativas) (N = 76) e HP + (<i>H. pylori</i> -positivas) (N = 67).....	36
Figura 6-	Níveis de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de adultos HP- (<i>H. pylori</i> -negativos) (N = 42) e HP + (<i>H. pylori</i> -positivos) (N = 101).....	38
Figura 7-	Correlação entre os níveis gástricos de IL-1 β e IL-1 α em adultos infectados pelo <i>H. pylori</i>	39
Figura 8-	Comparação entre os níveis de IL-1 β (A), IL-1 α (B), IL-8 (C) e TNF- α (D) na mucosa gástrica de adultos (N = 42) e crianças (N = 76) <i>H. pylori</i> -negativos.....	40
Figura 9-	Comparação entre os níveis de IL-1 β (A), IL-1 α (B), IL-8 (C) e TNF- α (D) na mucosa gástrica de adultos (N = 101) e crianças (N = 67) infectados pelo <i>H. pylori</i>	42
Figura 10-	Níveis de IL-8 na mucosa gástrica de crianças (A) e adultos (B) infectados por amostras de <i>H. pylori cagA</i> -negativas e -positivas.....	43
Figura 11-	Níveis de IL-8 na mucosa gástrica de crianças infectadas por amostras de <i>H. pylori</i> s2 (N = 28) e s1 (N = 29) (A) e m2 (N = 37) e m1 (N = 20) (B) de <i>vacA</i>	45
Figura 12-	Níveis de IL-8 na mucosa gástrica de adultos infectados por amostras s2 (N = 28) e s1 (N = 29) (A) e m2 (N = 37) e m1 (N = 20) (B) de <i>vacA</i>	46
Figura 13-	Comparação entre os níveis de IL-1 β na mucosa gástrica de adultos <i>H. pylori</i> -positivos com os genótipos selvagem (1/1) e polimórficos (1/2 e 2/2) do <i>ILRN</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

A – adenina

C– citosina

cagA - cytotoxin associated gene A

CTPP – confronting two-pairs primers

DNA - deoxirribonucleic acid

DNA_r – ribossomic deoxirribonucleic acid

G– guanina

IC – intervalo de confiança

IL-1 – interleucina 1

IL1A – interleukin 1 alpha gene

IL1B – interleukin 1 beta gene

IL1RN – interleukin 1 receptor antagonist gene

IL-8 – interleucina 8

Kb – quilobase

OR – odds ratio

pb – pares de bases

PBS – phosphate buffered saline

PCR – polymerase chain reaction

RFLP – restriction fragment length polymorphism

RNA – ribonucleic acid

mRNA – messenger ribonucleic acid

RT – reverse transcription

T – timina

TNF – tumor necrosis factor

TNFA – tumor necrosis factor alpha gene

ureA – urease gene A

vacA – vacuolating cytotoxin A

VNTR – variable number tandem repeats

RESUMO

No presente estudo determinaram-se as concentrações de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de crianças (n = 143) e adultos (n = 143) *H. pylori*-negativos e -positivos, com o objetivo de comparar os resultados dos diferentes subgrupos. Nos grupos *H. pylori*-positivos, os níveis das citocinas foram ainda comparados com base no genótipo *cagA* e mosaicismos do *vacA* da bactéria. Avaliou-se, também, a influência de polimorfismos em regiões promotoras dos genes *IL1B*, *IL1RN* e *TNFA* na expressão das citocinas na mucosa gástrica. O diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* foi feito por cultura, exame histopatológico e teste da urease pré-formada em fragmentos de mucosa do antro e corpo gástricos. O “status” *cagA* e mosaicismos do *vacA* foram investigados por PCR. Polimorfismos nos genes *IL1B* nas posições -31 e -511, *IL1RN* (diferentes repetições de 87 pb no íntron 2) e *TNFA* na posição -307 foram avaliados por PCR-CTPP, PCR-RFLP, PCR e PCR-RFLP, respectivamente. Procedeu-se ao sequenciamento para a confirmação dos resultados. A concentração das citocinas foi determinada em um fragmento de mucosa do antro gástrico por ensaio imunoenzimático. Os resultados das dosagens de citocinas foram apresentados como média \pm desvio padrão. Como os dados não apresentavam distribuição normal de acordo com teste de Kolmogorov-Smirnov, procedeu-se à transformação logarítmica, quando os parâmetros ficaram normalmente distribuídos. Para comparação dos níveis de citocinas entre os diversos grupos empregou-se o teste “t” de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. Dentre as crianças estudadas, 76 eram *H. pylori*-negativas e 67 *H. pylori*-positivas. Quarenta e dois adultos eram *H. pylori*-negativos e 101 *H. pylori*-positivos. Os níveis médios de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α foram significativamente maiores na mucosa gástrica de crianças e adultos infectados pelo *H. pylori* que daqueles *H. pylori*-negativos. No grupo de pacientes infectados pela bactéria, os níveis de IL-1 α e TNF- α foram maiores nas crianças que nos adultos. Os níveis de IL-1 β foram mais elevados nos adultos que

nas crianças independentemente do “status” *H. pylori*. Infecção por amostras *cagA*-positivas foi associada a níveis gástricos mais elevados de IL-8 tanto em adultos quanto em crianças. Níveis gástricos mais elevados de IL-8 associaram-se inicialmente com infecção por amostras de *H. pylori vacA s1m1*, mas quando os dados foram corrigidos pelo “status” *cagA*, a associação desapareceu. Nas crianças e adultos *H. pylori* negativos, não foi vista associação entre níveis gástricos de citocinas e polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN* e *TNFA*. De forma inédita, foi demonstrada associação entre a presença do alelo polimórfico do gene que codifica o antagonista do receptor da IL-1 e níveis mais elevados de IL-1 β , mas não de IL-1 α , na mucosa gástrica dos adultos infectados pela bactéria.

ABSTRACT

We evaluated the concentrations of IL-1 β , IL-1 α , IL-8, and TNF- α in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-negative and -positive children (n = 143) and adults (n = 143). The groups as well as subgroups of *cagA/vacA* positive subjects were compared. The levels of cytokines in *H. pylori* positive groups were also compared based on the bacterium *cagA* gene and *vacA* mosaicism status. The influence of the *IL1B*, *IL1RN*, and *TNFA* polymorphisms on the expression of gastric mucosa cytokines was also evaluated. *H. pylori* infection was diagnosed by culture, histology and preformed urease test. *cagA* and *vacA* status were investigated by PCR. Polymorphism of the genes *IL1B* at -31 and -511 positions, *IL1RN* (variable number tandem repeats) and *TNFA* at -307 position were evaluated by PCR-CTPP, PCR-RFLP, PCR, and PCR-RFLP, respectively. The results were confirmed by sequencing. Cytokine concentrations were determined in a fragment of gastric antral mucosa by immunoenzymatic assay. The results were presented as mean \pm standard deviation. Since the data did not show a normal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test, they were converted in logarithm, after which they showed normal distribution. The cytokine levels between the groups were compared by Student's t test. The differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$. Among the children, 76 were *H. pylori*-negative and 67 were *H. pylori*-positive. Forty two adults were *H. pylori* negative and 101 were *H. pylori* positive. The mean levels of IL-1 β , IL-1 α , IL-8, and TNF- α in the *H. pylori* infected children and adults were significantly higher than in those *H. pylori* negative. The levels of IL-1 α and TNF- α in the group of bacterium-infected patients were higher in the children than in the adults. The levels of IL-1 β were higher in the adults than in the children, regardless of the *H. pylori* status. The mean concentration of IL-8 was significantly higher in the groups of *cagA*-positive patients than in those of -negative ones. Similar results were observed in respect to s1m1 *vacA* genotype. This association; however, disappeared when the data were corrected

for the *cagA* status. No association between cytokine gastric levels and *IL1B*, *IL1RN* and *TNFA* polymorphisms was observed in the *H. pylori*-negative children and adults. On the other hand, we demonstrated, for the first time, that the concentration of IL-1 β , but not IL-1 α , was higher in the gastric mucosa of patients harboring the polymorphic alleles of *IL1RN* than in those with the wild allele.

1. INTRODUÇÃO

O isolamento do *Helicobacter pylori* a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite e úlcera duodenal, por dois pesquisadores australianos Berry J. Marshall e J. Warren Robin, foi considerado um marco na Medicina. A confirmação de que úlcera péptica é causada pela bactéria, melhorou consideravelmente as possibilidades de tratamento e cura da doença. Devido à relevância da descoberta, no ano de 2005, os dois pesquisadores foram agraciados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina.

A INFECÇÃO PELO *H. pylori*

O *H. pylori* é, atualmente, aceito como o principal agente de gastrite em seres humanos e um fator essencial na patogênese de úlcera péptica, desempenhando, também papel fundamental na cadeia de eventos que culminam com o desenvolvimento de carcinoma gástrico e linfoma gástrico do tipo MALT (tecido linfóide associado à mucosa) (Forman *et al.*, 1991; Parsonet *et al.*, 1991; Marshall, 1994; Cover & Blaser, 1995; Wotherspoon & Path, 1998). Em 1994, a Agência Internacional para Pesquisa de Câncer da Organização Mundial de Saúde considerou a infecção pelo *H. pylori* carcinogênica do tipo I (IARC, 1994) com base em evidências epidemiológicas e plausibilidade biológica (Correa, 1991; Parsonnet *et al.*, 1994; Blaser, 1995; Correa, 1995; Tsuji *et al.*, 1997).

A infecção é muito freqüente, acometendo cerca de 60% da população mundial. Nos países em desenvolvimento 80 a 90% da população encontram-se infectados (Blaser, 1993; Blaser & Parsonnet, 1994; Hamilton-Miller, 2003). A aquisição da infecção ocorre predominantemente na infância, na idade pré-escolar, por via oral-oral ou fecal-oral (Lee, 1994; Rocha *et al.*, 2003) e está associada a fatores como baixo nível socioeconômico,

maior aglomeração familiar, condições de higiene precárias e ausência ou deficiência de saneamento básico (Malaty & Graham, 1994; Goodman *et al.*, 1996; Sarker *et al.*, 1997).

A infecção pelo *H. pylori* está sempre associada à presença de gastrite à histologia (Blaser, 1990); entretanto, apenas em parte das pessoas infectadas (15% a 20%) ocorrem as complicações como úlcera péptica ou carcinoma/linfoma gástricos (Forman *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1991; Wotherspoon & Path, 1998). Os mecanismos pelos quais a bactéria causa doença não estão completamente esclarecidos. Provavelmente, fatores ligados ao ambiente, ao hospedeiro e ao microrganismo determinam o surgimento das diversas afecções.

FATORES DE VIRULÊNCIA DO *H. pylori*

Vários fatores de patogenicidade são comuns a todas as amostras de *H. pylori* como a motilidade e a morfologia em espiral, a produção da enzima urease e a habilidade para aderir ao tecido do hospedeiro (Hazel *et al.*, 1986; Bode *et al.*, 1989). Outros são identificados somente em algumas amostras de *H. pylori* e parecem relacionadas ao surgimento das doenças graves associadas à infecção. Dentre os fatores de virulência que não estão presentes em todas as amostras devem ser ressaltadas a citotoxina vacuolizante (VacA) e a ilha de patogenicidade *cag* (*cag* PAI).

O gene *cagA* é um marcador da *cag* PAI, um fragmento de DNA de 40Kb e que contém cerca de 31 genes. O conteúdo de G + C (35%) da *cag* PAI difere do conteúdo de G + C do resto do genoma da bactéria (39%), sugerindo que *cag* PAI tenha sido adquirida horizontalmente e integrada ao cromossomo de *H. pylori* (Tomb *et al.*, 1997; Covacci *et al.*, 1999). Alguns genes da ilha codificam proteínas que formam um sistema de secreção do tipo IV (Censini *et al.*, 1996; Backert *et al.*, 2000; Odenbreit *et al.*, 2000) responsável pela translocação da proteína CagA, de 120 Kda, para dentro do citoplasma das células

epiteliais gástricas, onde é fosforilada pelas quinases c-Src e Lyn das células do hospedeiro. Depois de fosforilada, se liga e ativa a fosfatase celular SHP-2, desencadeando mudanças no citoesqueleto, levando à formação de pedestais que permitem maior aderência bacteriana. Vários genes da ilha estão, ainda, envolvidos na estimulação da produção de interleucina 8 (IL-8) pelas células epiteliais gástricas. A IL-8 é um potente fator quimiotático e ativador de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos contribuindo para uma resposta inflamatória mais acentuada nos pacientes colonizados por amostras *cag* PAI positivas. Outras atividades associadas à *cag* PAI incluem ativação da transcrição do fator AP-1 e ativação da expressão dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun*, que desempenham papel crucial na proliferação e transformação celular predispondo à oncogênese (Crabtree *et al.*, 1994; Rautelin *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 1995; Husson *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2000; Gerhard *et al.*, 2002; Suerbam & Michete, 2002; Basso & Plebani, 2004; Kim *et al.*, 2006). A infecção por amostras *cagA*-positivas está associada à úlcera péptica (Crabtree *et al.*, 1991; Covacci *et al.*, 1993, Queiroz *et al.*, 2000, Nomura *et al.*, 2002; Erzin *et al.*, 2006; Gatti *et al.*, 2006), gastrite atrófica (Kupiers, 1995) e adenocarcinoma gástrico (Blaser *et al.*, 1995; Queiroz *et al.*, 1995; Queiroz *et al.*, 1998; Miehke *et al.*, 2000; Held *et al.*, 2004; Con *et al.*, 2006; Sicinski *et al.*, 2006).

O gene *vacA*, presente em todas amostras de *H. pylori*, codifica uma citotoxina vacuolizante capaz de induzir diretamente a formação de vacúolos intracitoplasmáticos, a destruição de mitocôndrias, a liberação de citocromo c e a morte de células epiteliais por apoptose, eventos que lesam a mucosa gástrica. Além disso, a toxina aumenta a permeabilidade epitelial, o que pode facilitar tanto a passagem de substância tóxicas para dentro do epitélio como a difusão de nutrientes para a camada mucosa favorecendo a sobrevivência do *H. pylori* (Covacci *et al.*, 1997; Kuck *et al.*, 2001; Gebert *et al.*, 2003; Basso & Plebani, 2004; Nakayama *et al.*, 2004). *VacA* ainda estimula a resposta

inflamatória da mucosa gástrica por diferentes mecanismos, como por exemplo, pelo aumento da expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) não somente em células T, mas também em neutrófilos e macrófagos (Montecucco & Bernard, 2003). Sun *et al.* (2006) demonstraram que a citotoxina é capaz de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-8 e TNF- α em cultura de células epiteliais gástricas. Também, há fortes evidências de que VacA tenha atividade imunossupressora. Testes realizados *in vitro* demonstram que a toxina inibe a proliferação de linfócitos T induzidos por ativadores policlonais (Boncristiano *et al.*, 2003; Gebert *et al.*, 2003). No gene *vacA* há duas famílias sinalizadoras, denominadas s1 e s2, com variações s1a, s1b e s1c; bem como, duas regiões médias, m1 e m2. Padrões distintos estão associados com amostras produtoras ou não da toxina e diferenças quantitativas de produção (Atherton *et al.*, 1995). As amostras de *H. pylori* tipo s1 são consideradas mais virulentas que as s2 e são mais frequentemente isoladas de pacientes com úlcera péptica (Atherton *et al.*, 1995; van Doorn *et al.*, 1999, Gusmão *et al.*, 2000; Erzin *et al.*, 2006) e carcinoma gástrico (Evans *et al.*, 1998; Kidd *et al.*, 1999; van Doorn *et al.*, 1999; Miehlke *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Kamali-Sarvestani *et al.*, 2006) que daqueles com gastrite.

A presença de marcadores de virulência; entretanto, não é suficiente para prever se um paciente irá desenvolver doença grave ou não. Outros fatores, como o ambiente e a genética do hospedeiro influenciam na evolução da infecção.

FATORES RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO

Quanto ao papel do hospedeiro pouco se conhece. Fatores como genética, idade e sexo podem determinar o tipo de resposta imunológica e inflamatória à infecção, que por sua vez pode definir o desfecho em doença ou não. Dentre os fatores genéticos,

polimorfismos em regiões promotoras de genes que codificam citocinas são bons candidatos.

Denomina-se polimorfismo a ocorrência simultânea, em uma população, de um ou mais genótipos alternativos ao genótipo selvagem, numa frequência superior àquela esperada de variações do genoma decorrentes de mutações espontâneas (Thompson *et al.*, 1993). Variações alélicas nas regiões promotoras de genes que codificam citocinas podem alterar a transcrição gênica aumentando ou diminuindo a produção das citocinas e dessa forma a resposta imunológica do hospedeiro.

Citocinas são polipeptídeos produzidos por células especializadas da resposta imunológica como monócitos e linfócitos bem como por células não especializadas como células endoteliais e algumas células epiteliais em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias (Abbas & Lichtman, 2005). Dentre as diversas funções biológicas das citocinas nas doenças associadas à infecção pelo *H. pylori*, destaca-se a pró-inflamatória. Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α têm sido consideradas relevantes no curso da infecção pelo microrganismo, devido a vários fatores, como o fato de que as células epiteliais gástricas produzem IL-1 β (Yamaoka *et al.*, 1997; Katagiri *et al.*, 1997; Lindholm *et al.*, 1998; Vilaichone *et al.*, 2005). Ainda, no estômago, além de induzir inflamação, a IL-1 β atua diretamente na célula parietal, inibindo a secreção ácida. Ações semelhantes, embora em menor intensidade, têm sido atribuídas ao TNF- α . Assim, indivíduos *H. pylori*-positivos carreadores dos alelos associados com maior produção das duas citocinas teriam uma ampliação das lesões na mucosa, em decorrência do aumento da inflamação e da ação anti-secretória das citocinas. A alcalinização do corpo gástrico criaria condição favorável para a colonização do *H. pylori* nessa região que, habitualmente, é menos colonizada em decorrência da acidez que exerce controle negativo sobre a densidade bacteriana. O grau

de inflamação do corpo gástrico tenderia a aumentar, levando à atrofia, com destruição das células parietais, perpetuando a situação e aumentando o risco da carcinogênese (El Omar *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2002). De fato, polimorfismos no gene que codifica a IL-1 β na posição -31 (T \rightarrow C) e -511 (C \rightarrow T) e no gene que codifica o antagonista de receptor da IL-1 (alelo curto) foram associados a risco aumentado de atrofia gástrica e câncer gástrico em populações caucasianas da Polônia e Escócia (El Omar *et al.*, 2000), bem como de Portugal (Machado *et al.*, 2001). Entretanto, esses resultados não foram observados em países asiáticos (Kato *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003) e foram reproduzidos apenas parcialmente no Brasil, em um trabalho conduzido no LPB (Rocha *et al.*, 2005). Os autores demonstraram que o genótipo polimórfico do *IL1RN*, mas não do *IL1B*, está independentemente associado ao risco de carcinoma gástrico na nossa população (Rocha *et al.*, 2005). No que se refere ao polimorfismo no TNFA na posição -307 (G \rightarrow A), também foi visto estar associado a carcinoma gástrico em pacientes portugueses e americanos (Machado *et al.*, 2003; El Omar *et al.*, 2003), o que não foi observado na nossa população (Rocha *et al.*, 2005), sugerindo a existência de diferenças regionais e ou/ étnicas.

1.5. INFECÇÃO POR *H. pylori* E NÍVEIS GÁSTRICOS DE CITOCINAS

O perfil de citocinas na infecção pelo *H. pylori* tem sido estudado, sobretudo em adultos. Noach *et al.* (1994), usando ensaio imunoenzimático, observaram níveis de IL-1 β e TNF- α significativamente maiores na mucosa gástrica de pacientes holandeses com a infecção pelo *H. pylori* quando comparados com aqueles sem a infecção. No estudo de Fan *et al.* (1995), além do aumento na concentração de TNF- α , os autores observaram aumento de IL-8 na vigência da infecção em pacientes irlandeses.

Resultados semelhantes foram relatados por Peek *et al.* (1995)b quando estudaram uma população americana, avaliando, por ensaio imunoenzimático, os níveis de IL-8 na mucosa gástrica de pacientes *H. pylori*-positivos e negativos. Ainda, os autores observaram que os níveis de IL-8 eram significativamente maiores nos pacientes colonizados por amostras *cagA*-positivas. No mesmo estudo, embora tenha sido demonstrado aumento de expressão de mRNA de IL-1 α e IL-1 β na mucosa gástrica dos indivíduos infectados pelo *H. pylori*, não houve diferença significativa na concentração de IL-1 α , determinada por ensaio imunoenzimático, entre o grupo infectado e não infectado. Resta ressaltar que a determinação foi feita em um número muito pequeno de indivíduos (7 *H. pylori*-negativos e 14 *H. pylori*-positivos).

Na população asiática há dois estudos, ambos avaliando pacientes japoneses (Yamaoka *et al.*, 1997; Katagiri *et al.*, 1997). No primeiro, os autores (Yamaoka *et al.*, 1997) demonstraram concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-8 significativamente maiores na mucosa gástrica dos pacientes infectados que daqueles sem a infecção. À semelhança do estudo de Peek *et al.* (1995)b, os níveis de IL-1 β e IL-8 eram maiores nos pacientes colonizados por amostras de *H. pylori cagA*-positivas. No segundo trabalho, Katagiri *et al.* (1997) observaram que os níveis de TNF- α eram significativamente maiores nos pacientes infectados quando comparados com aqueles sem infecção.

Há poucos trabalhos avaliando a participação de citocinas na infecção por *H. pylori* em crianças. Kutukçuler *et al.* (1997) observaram níveis elevados de TNF- α no sobrenadante de cultura de mucosa gástrica de crianças polonesas *H. pylori*-positivas. Em um estudo realizado no Chile, Guiraldes *et al.* (2001) demonstraram que os níveis de IL-1 β , IL-8 e TNF- α eram significativamente maiores na mucosa gástrica de crianças infectadas pela bactéria. Expressão de IL-8 na mucosa gástrica de crianças italianas, detectada por RT-PCR (Luzza *et al.*, 2001), bem como de crianças japonesas, detectada

por ensaio imunoenzimático (Shimizu *et al.* 2004), foi vista estar associada à infecção pela bactéria.

1.6. EFEITOS DE POLIMORFISMOS DOS GENES *IL1B*, *IL1RN* E *TNFA* NOS NÍVEIS DE CITOCINAS NA MUCOSA GÁSTRICA DE PACIENTES COM INFECÇÃO PELO *H. pylori*

Em 1998, Santtila *et al.* demonstraram, em cultura de mononucleares de sangue periférico, que genótipos polimórficos do gene *IL1B* na posição -511 não diferiram do genótipo selvagem quanto à produção de IL-1 β . Por outro lado, monócitos de indivíduos com genótipo polimórfico do *IL1RN* produziram níveis mais elevados de IL-1 β comparados com monócitos de indivíduos com o genótipo selvagem, embora os autores não soubessem explicar o achado.

Na mucosa gástrica, o primeiro estudo que investigou o efeito de polimorfismos dos genes *IL1B* e *IL1RN* nos níveis de IL-1 β foi realizado por Hwang *et al.* (2002) em pacientes japoneses *H. pylori*-positivos. Os autores demonstraram que a concentração gástrica da citocina era maior nos pacientes com o genótipo polimórfico T/T do *IL1B* na posição -511, bem como no genótipo polimórfico do *IL1RN* que naqueles com genótipos selvagens. Resultados semelhantes foram obtidos por Vilaichone *et al.* (2005) em pacientes da Tailândia. Contrariando esses autores, em um outro estudo com japoneses, Xuan *et al.* (2005) observaram níveis de IL-1 β significativamente maiores na mucosa gástrica de pacientes com o genótipo *IL1B* -511 C/C, considerado selvagem. Essas divergências podem ser explicadas de várias maneiras. Vale salientar; entretanto, que o número de indivíduos incluídos em todos os estudos mencionados foi pequeno e que o grupo composto pelos pacientes *H. pylori*-positivos era muito heterogêneo incluindo

vários diagnósticos como carcinoma gástrico, úlcera péptica gástrica, úlcera péptica duodenal e linfoma MALT gástrico. Ainda, os trabalhos avaliaram populações asiáticas, cujos dados não podem ser extrapolados para populações ocidentais, uma vez que os asiáticos possuem muitas características distintas, incluindo algumas relacionadas à fisiologia gástrica, como um pH gástrico naturalmente mais alcalino.

Resta relatar que há um único trabalho avaliando população ocidental. Rad *et al.* (2004) estudaram 70 europeus caucasianos e não observaram diferenças nos níveis de mRNA de IL-1 β entre os genótipos selvagem e polimórfico nas posições do -511 e -31 do *IL1B*. À semelhança do observado na população asiática, os genótipos polimórficos do *IL1RN* associaram-se significativamente com níveis mais elevados de mRNA de IL-1 β . Nesse estudo foi também avaliado o efeito do polimorfismo do gene *TNFA* nos níveis de mRNA de TNF- α na mucosa gástrica de pacientes infectados pelo *H. pylori*, não tendo sido observada diferença entre os diferentes alelos.

Finalmente, merece destaque o fato de que não existem trabalhos na literatura até o presente momento avaliando associação entre polimorfismos em genes que codificam citocinas e níveis de citocinas na mucosa gástrica de crianças infectadas ou não pelo *H. pylori*. Uma vez que a infecção pelo *H. pylori* é predominantemente adquirida na infância (Blaser, 1993; Mégraud, 1993; Fall *et al.*, 1997; Redlinger *et al.*, 1999), é muito importante compreender a participação da resposta inflamatória nessa faixa etária. Vale ressaltar que resultados observados em pacientes adultos não podem ser extrapolados para a população infantil visto que trabalhos publicados até o momento mostram que existem diferenças na resposta imunológica humoral (Oliveira *et al.*, 1999; Kindermann *et al.*, 2001), grau de inflamação da mucosa gástrica (Queiroz *et al.*, 1991) e resposta imunológica celular (Soares *et al.*, 2005) entre crianças e adultos na vigência da infecção.

Em crianças, Queiroz *et al.* (2005) demonstraram que o genótipo polimórfico do *IL1RN* associou-se à úlcera duodenal na nossa população.

Com base no descrito acima e considerando que não há estudos avaliando se polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN* e *TNFA* são funcionais na nossa população, visto que a expressão de citocinas pode ser influenciada por diferenças étnicas e regionais e a população brasileira é formada por uma mistura homogênea de caucasianos (portugueses colonizadores), africanos (escravos) e ameríndios (nativos); e que não há estudos avaliando níveis gástricos de IL-1 α na dependência de polimorfismos do *IL1RN* bem como investigando possíveis influências do fator de virulência *vacA* do *H. pylori* na expressão de citocinas na mucosa gástrica, esse trabalho tem como objetivos:

2. OBJETIVOS

- 1)- Determinar as concentrações de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de crianças e adultos *H. pylori*-negativos e -positivos, comparando os resultados dos diferentes subgrupos.
- 2)- Comparar as concentrações gástricas das citocinas de acordo com o genótipo *cagA* e mosaicismismo do *vacA* da bactéria.
- 3)- Avaliar a influência de polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN* e *TNFA* nas concentrações de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de crianças e adultos, levando, também, em consideração o “status” *H. pylori*.

3. PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer n° ETIC 005/99) e foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da Faculdade de Medicina/UFMG.

O termo de consentimento informado (anexo 1) para participar do estudo foi assinado pelos adultos, crianças (sempre que possível) e seus pais ou responsáveis.

3.1. PACIENTES

Foram estudadas 143 crianças (62 meninos e 81 meninas; média de idade de $9,1 \pm 3,4$ anos; faixa etária de 1 a 18 anos) e 143 adultos (60 homens e 83 mulheres; média de idade de $49,9 \pm 16,6$ anos; faixa etária de 19 a 87 anos), não consecutivos, submetidos à esofagogastroduodenoscopia para esclarecimento de sintomas relacionados ao trato digestivo superior.

Não foram incluídos pacientes com história de hipertensão portal, distúrbios hematológicos com tendência a sangramento ou qualquer condição que dificultasse a passagem do endoscópio. Pacientes com úlcera duodenal, câncer gástrico, bem como aqueles com doença maligna, auto-imune ou doença grave, tratados previamente para erradicação do *H. pylori* ou aqueles que fizeram uso de antimicrobianos, de antagonistas dos receptores H_2 , inibidores de bomba de prótons ou antiinflamatórios não esteróides no mês anterior à realização do exame também não foram incluídos.

3.2. COLHEITA DE FRAGMENTOS DE MUCOSA GÁSTRICA E AMOSTRAS DE SANGUE

Fragmentos de mucosa gástrica foram obtidos durante a esofagogastroduodenoscopia, com o paciente em jejum de no mínimo 8 horas, depois de ter recebido diazepam (5mg por via oral) e anestesia tópica da orofaringe com Cloridrato de Lidocaína (Xilocaína spray a 10%). As crianças, quando necessário, foram submetidas à anestesia geral para a realização do exame. Fragmentos da mucosa gástrica foram colhidos da pequena curvatura do antro e da grande curvatura do corpo gástrico para o diagnóstico da infecção, estudo histopatológico para a pesquisa do microrganismo e dosagem de citocinas.

Para a avaliação da presença de polimorfismos nos genes que codificam citocinas foram colhidos, por punção venosa, 3 ml de sangue de cada paciente. As amostras foram centrifugadas e os leucócitos separados e conservados a -80° até o uso.

3.3. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE *H. pylori*

Os fragmentos de mucosa gástrica para a cultura de *H. pylori* foram mantidos, logo depois da colheita, em meio de transporte (Caldo de infusão de cérebro-coração, Difco, Detroit, MI, EUA) à temperatura de 4°C (banho de gelo), e processados dentro de, no máximo, duas horas. Os fragmentos foram homogeneizados em um triturador de tecido e semeados em meio Belo Horizonte (Queiroz *et al.*, 1987), composto por ágar-infusão de cérebro-coração (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com sangue de carneiro a 10%, 6 mg/L de vancomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), 20 mg/mL de ácido nalidíxico (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e 40mg/mL de cloreto de trifeniltetrazólio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil). As placas incubadas a 37°C sob

atmosfera de microaerofilia obtida com o emprego de anaerocult C® (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram avaliadas no 3°, 7° e 11° dias.

A identificação do microrganismo foi feita com base na morfologia macroscópica (colônias puntiformes, circulares, convexas e não hemolíticas, de coloração dourada brilhante), na morfologia microscópica à coloração pela carbolfucsina (bastonetes espiralados corados em vermelho) (Rocha *et al.*, 1989), no teste da urease pré-formada e reações da oxidase e da catalase positivos (Mac Faddin, 1980) e na PCR para detecção do gene *ureA* (Clayton *et al.*, 1992) e do *DNAr 16S* (Fox *et al.*, 1998).

Foram feitos repiques das amostras isoladas e o crescimento correspondente a uma placa de Petri de 60 mm foi removido com zaragatoa estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga contendo 500 µL de água quimicamente pura esterilizada para extração de DNA. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o sedimento mantido a -80°C até o momento do uso.

3.4. EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DE *H. pylori*

O DNA das amostras foi extraído usando o kit QIAamp® (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Para controle da extração foi usada água destilada. Os sedimentos foram colocados em tubos de microcentrífuga contendo 180 µL do tampão ATL e 20 µL de proteinase K, homogeneizados em vórtex, e incubados a 56°C por 18 horas. A cada amostra foram acrescentados 200 µL de tampão AL e os tubos foram incubados a 70°C por 10 minutos. A seguir, 200 µL de etanol (96-100%) foram adicionados a cada tubo e essa mistura foi transferida para a coluna “spin” do “kit” que foi centrifugada a 6.000 g por 1 minuto. Cada coluna foi colocada então dentro de um tubo coletor de 2 mL. O material da coluna foi lavado duas vezes (250 µL cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas vezes com o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) do “kit”. Depois da última

lavagem, cada coluna foi inserida no interior de um tubo de microcentrífuga e o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado. O DNA foi eluído em 100 µL de água deionizada estéril. Determinou-se a concentração do DNA por espectrofotometria. O DNA extraído foi estocado a -20°C até o uso.

3.4.1. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *DNAr 16S* e *ureA* ESPECÍFICOS DE *H. pylori*

A amplificação do gene que codifica o *DNAr 16S* e do *ureA* foi feita por PCR de acordo com as metodologias descritas por Fox *et al.* (1998) e por Clayton *et al.* (1992), respectivamente. Os iniciadores usados e as condições de reação estão descritos na tabela 1.

Os produtos amplificados foram identificados por eletroforeses em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo e examinado em luz ultravioleta.

3.4.2. PESQUISA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DO *H. pylori*

Para aumentar a sensibilidade de detecção do *cagA*, foram usados dois pares de iniciadores: os descritos por Kelly *et al.* (1994) e os propostos por Peek *et al.* (1995)a. Iniciou-se a pesquisa com os iniciadores de Peek *et al.* (1995)a. Quando o resultado foi negativo, foram usados os iniciadores descritos por Kelly *et al.* (1994). As condições da reação estão descritas na tabela 1. Foram consideradas *cagA*-positivas as amostras que apresentaram resultado positivo em pelo menos uma das reações e *cagA*-negativas, quando o resultado das duas reações foi negativo.

Para a determinação do mosaicismos do *vacA* foram usados os iniciadores e condições descritas previamente por Atherton *et al.* (1995) (tabela 1).

3.5. TESTE DA UREASE PRÉ-FORMADA

Um fragmento de mucosa do antro e um do corpo gástrico foram introduzidos em frascos contendo Hp Uréia Teste® (Resende *et al.*, 1993) e incubados a 37°C por até 24 horas. A leitura da reação foi feita ao final da primeira e da vigésima quarta horas. O teste foi considerado positivo quando se observou, dentro desse prazo, mudança da cor do meio de âmbar para rósea.

3.6. CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE PARA *H. pylori*

Os pacientes foram considerados *H. pylori*-positivos quando a cultura foi positiva ou pelo menos dois dentre os demais testes foram positivos e *H. pylori*-negativos quando os resultados de todos os testes foram negativos.

3.7. EXTRAÇÃO DO DNA DE LEUCÓCITOS E AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE POLIMORFISMOS NOS GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS

3.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA de leucócitos foi extraído com o “kit” QIAamp® (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Para controle da extração foi usada água destilada. Foram colocados 200 µL de leucócitos em tubos de microcentrífuga contendo 200 µL do tampão ATL e 20 µL de proteinase K, homogeneizados em vórtex, e incubados a 56°C por 10 minutos. A seguir, 200 µL de etanol (96-100%) foram adicionados a cada tubo e essa mistura foi transferida para a coluna “spin” do “kit” que foi centrifugada a 6.000 g por 1 minuto. Cada coluna foi colocada dentro de um tubo coletor de 2 mL. O material da coluna foi lavado duas vezes (250 µL cada) com o primeiro tampão (Buffer AW1) e duas vezes com

o segundo tampão de lavagem (Buffer AW2) do “kit”. Depois da última lavagem, cada coluna foi inserida no interior de um tubo de microcentrífuga e o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado. O DNA foi eluído em 100 μ L de água deionizada estéril. Determinou-se a concentração do DNA por espectrofotometria. O DNA extraído foi estocado a -20°C até o uso.

3.7.2. PESQUISA DA PRESENÇA DE POLIMORFISMO NOS GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS

- *IL1B* e *IL1RN*

A pesquisa de polimorfismos na região promotora do gene que codifica a IL-1 β , na posição -511, onde ocorre substituição de um par de bases (C \rightarrow T), foi feita de acordo com a metodologia descrita por Mansfield *et al.* (1994) pela técnica de PCR-RFLP. Os iniciadores usados e as condições da reação estão descritos na tabela 2.

A amplificação seguida por digestão dos produtos da PCR pela enzima *AvaI* permite que os alelos sejam identificados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos obtidos de acordo com o genótipo é: C/C, 190 e 114 pb; C/T, 304, 190 e 114 pb e T/T, 304 pb (figura 1).

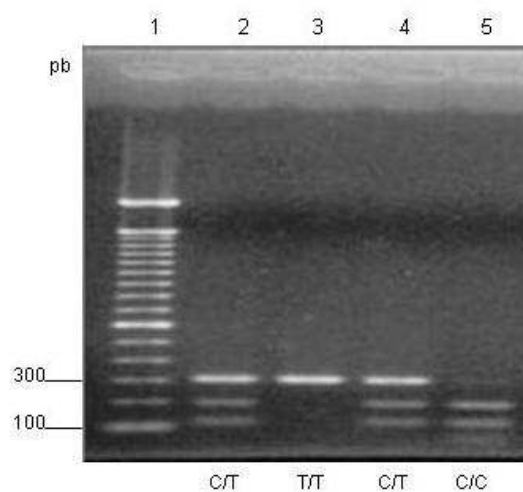


Figura 1- Gel de agarose dos produtos amplificados do gene *IL1B* na posição -511(PCR-RFLP). Na canaleta 2 e 4, amostras com o perfil heterozigoto; canaleta 3, amostra com o perfil homozigoto polimórfico; canaleta 5, amostra com o perfil homozigoto selvagem; canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Invitrogen).

A pesquisa de polimorfismo do gene *IL1B* na posição -31, onde ocorre a substituição de um único par de bases (T→C), foi feita por PCR-CTPP de acordo com metodologia descrita por Hamajima *et al.* (2001). Os dois pares de iniciadores usados e as condições da reação estão descritos na tabela 2. Os produtos de PCR foram vistos em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídio. A identificação do genótipo foi feita de acordo com o tamanho dos fragmentos obtidos: C/C, 574 e 345 pb; T/C, 574, 345 e 266 pb e TT-574 e 266 pb (figura 2).

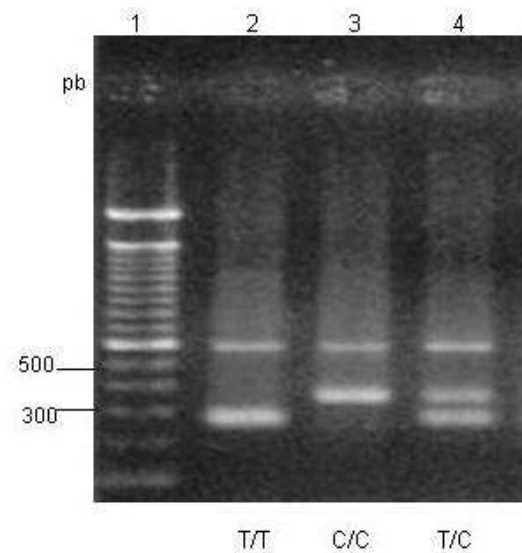


Figura 2. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene *IL1B* na posição -31 (PCR-CTPP). Na canaleta 2, amostra com o perfil homozigoto selvagem (T/T); canaleta 3, amostra com o perfil homozigoto polimórfico (C/C); canaleta 4 amostra com perfil heterozigoto(T/C); canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega).

O polimorfismo pentalélico do gene *ILIRN* que corresponde a diferentes repetições de uma sequência de 87 pares de bases no intron 2 do gene foi pesquisado por PCR de acordo com a metodologia proposta por Mansfield *et al.* (1994). Os iniciadores usados e as condições de reação estão descritos na tabela 2. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídio: alelo 1 -410 pb (4 repetições), alelo 2 -240 pb (2 repetições), alelo 3 -500 pb (5 repetições), alelo 4 -325 pb (3 repetições) e alelo 5 -595 pb (6 repetições) (figura 3).

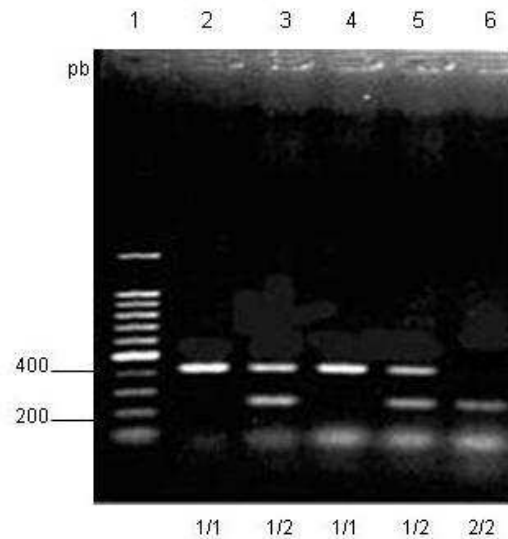


Figura 3. Gel de agarose dos produtos amplificados do gene *ILIRN* (PCR). Na canaleta 2 e 4, amostras com o perfil *ILIRN*1/1; canaleta 3 e 5, amostra com o perfil *ILIRN*1/2; canaleta 6, amostra com o perfil *ILIRN*2/2; canaleta 1, padrão de peso molecular (100 pb, Promega).

- *TNFA*

O polimorfismo de um único par de bases na posição -307 (substituição de G→A) foi pesquisado pela técnica de PCR-RFLP de acordo com a metodologia descrita por Mansfield *et al.* (1994). Os iniciadores e as condições da reação estão descritos na tabela 2. O produto do gene amplificado foi digerido com a enzima de restrição *Nco*I: a presença de duas bandas de 87 e 20 pb corresponde ao alelo G e a presença de uma banda de 107 pb ao alelo A (figura 4). O produto de PCR-RFLP foi analisado em gel de poliacrilamida a 12% e corado com brometo de etídio.

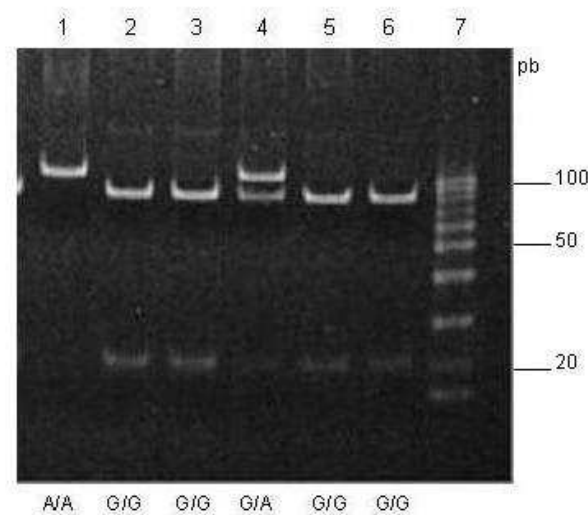


Figura 4. Gel de acrilamida dos produtos amplificados do gene *TNFA* (PCR-RFLP). Na canaleta 1, amostra com o perfil homocigoto polimórfico; canaleta 2, 3, 5 e 6, amostra com o homocigoto selvagem; canaleta 4, amostra com o perfil heterocigoto; canaleta 1, padrão de peso molecular (10 pb, Promega).

3.7.3. SEQUENCIAMENTO PARA CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS

A presença dos polimorfismos foi confirmada pelo sequenciamento direto dos produtos amplificados. Depois de terem sido purificados, os produtos foram seqüenciados com o “kit” de reação ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante e os iniciadores descritos anteriormente (tabela 2) em um seqüenciador automático de DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As seqüências foram alinhadas usando o programa Cap da Infobiogen (www.infobiogen.fr/) e comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

3.8. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS FRAGMENTOS DE MUCOSA GÁSTRICA

Para a dosagem de citocinas, um fragmento de mucosa do antro gástrico foi congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C , imediatamente depois da colheita. Para a extração de proteína, o fragmento foi homogeneizado em 1,5 mL de PBS (pH = 7,4) contendo inibidor de protease (aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em um triturador de tecido. A solução foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi distribuído em alíquotas e mantido a -80°C até o uso.

3.9. DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL

A dosagem de proteína total foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bradford. (1976). Resumidamente, 200 μL do reagente de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foram adicionados a 10 μL do sobrenadante. A absorbância foi lida em espectrofotômetro com filtro de 595 nm. As concentrações de proteína foram determinadas a partir da comparação dos valores de densidade óptica das amostras testadas com aqueles de

uma curva padrão construída a partir de concentrações diferentes (de 1 µg/mL a 35 µg/mL) de albumina bovina. Todas as amostras foram testadas em duplicata. Só foram avaliadas amostras contendo no mínimo 10 µg/mL de proteína.

3.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NA MUCOSA GÁSTRICA

IL-1β

A concentração de IL-1β foi determinada por método imunoenzimático com o “kit human IL-1β” (BioSource, Camarillo, EUA), que usa anticorpos específicos para IL-1β humana. A reação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 50 µL das amostras, dos padrões e dos controles foram adicionados aos orifícios de uma placa de microtitulação e a seguir 100 µL do conjugado (anti-IL-1β marcado com biotina) foram acrescentados a cada orifício da placa. A placa foi incubada por duas horas à temperatura ambiente e lavada quatro vezes com o tampão de lavagem. Então, foram acrescentados a cada orifício 100 µL de uma solução de estreptoavidina-peroxidase e a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de uma nova série de quatro lavagens foram acrescentados 100 µL da solução do substrato contendo tetrametilbenzidina a cada orifício da placa que foi incubada novamente por 25 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL da solução “stop”. A leitura da densidade óptica foi feita em espectrofotômetro (Sunrise, Salzburg, Áustria) com filtro de 450 nm, imediatamente depois do término da reação. As concentrações de IL-1β foram determinadas pela comparação dos valores de densidade óptica das amostras testadas com aqueles de uma curva padrão construída a partir de concentrações diferentes das amostras

padrão. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. Os níveis de IL-1 β foram expressos como pg/mg de proteína total.

-IL-1 α

A concentração de IL-1 α foi feita por método imunoenzimático com o “kit human IL-1 α ” (BioSource, Camarillo, EUA), que usa anticorpos específicos para IL-1 α humana. A reação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, 50 μ L das amostras, dos padrões e dos controles foram adicionados aos orifícios de uma placa de microtitulação. Em seguida, foram adicionados a cada orifício da placa 50 μ L de tampão de incubação e 100 μ L do conjugado (anti-IL-1 α marcado com biotina). A placa foi incubada por duas horas à temperatura ambiente, lavada quatro vezes com o tampão e a seguir foram acrescentados a cada orifício 100 μ L de uma solução de estreptoavidina-peroxidase. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de uma nova etapa de lavagem, 100 μ L da solução do substrato contendo tetrametilbenzidina foram acrescentados a cada orifício da placa que foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L da solução “stop”. A leitura da densidade óptica foi feita em leitor de ELISA (Sunrise, Salzburg, Áustria) com filtro de 450 nm, imediatamente depois do término da reação. As concentrações de IL-1 α foram determinadas pela comparação dos valores de densidade óptica das amostras testadas com aqueles de uma curva padrão construída a partir de concentrações diferentes das amostras padrão. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. Os níveis de IL-1 α foram expressos como pg/mg de proteína total.

- TNF- α

A concentração de TNF- α foi avaliada por método imunoenzimático com o “kit human TNF- α ” (BioSource, Camarillo, Estados Unidos), que usa anticorpos específicos para o TNF- α humano. A reação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 50 μ L de tampão de incubação e 100 μ L dos controles e das amostras foram adicionados a cada orifício de uma placa de microtitulação que foi incubada por duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com o tampão de lavagem e 100 μ L do conjugado (anti-TNF- α marcado com biotina) foram adicionados a cada orifício da placa que foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. A seguir a placa foi lavada quatro vezes com o tampão de lavagem e 100 μ L de estreptoavidina-peroxidase foram acrescentados a cada orifício da placa. Depois de 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e um novo ciclo de lavagem, 100 μ L da solução do substrato contendo tetrametilbenzidina foram acrescentados a cada orifício da placa que foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L da solução “stop”. A leitura da densidade ótica foi feita em leitor de ELISA (Sunrise, Salzburg, Áustria) com filtro de 450 nm, imediatamente depois do término da reação. As concentrações de TNF- α foram determinadas pela comparação dos valores de densidade ótica das amostras testadas com aqueles de uma curva padrão construída a partir de concentrações diferentes das amostras padrão. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. Os níveis de TNF- α foram expressos como pg/mg de proteína total.

- IL-8

A concentração de IL-8 foi investigada por método imunoenzimático com o “kit human IL-8/NAP-1” (BioSource, Camarillo, EUA), que usa anticorpos específicos para IL-8 humana. A reação foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 50 μ L das amostras, dos padrões e dos controles e 50 μ l do conjugado (anti-IL-1 β marcado com biotina) foram adicionados a cada orifício de uma placa de microtitulação, que foi incubada por duas horas à temperatura ambiente. A seguir, a placa foi lavada quatro vezes com o tampão de lavagem e, foram acrescentados aos orifícios 100 μ L de uma solução de Estreptoavidina-peroxidase. Depois de 30 minutos de incubação e novo ciclo de lavagem, 100 μ L da solução do substrato contendo tetrametilbenzidina foram acrescentados a cada orifício e a placa foi incubada por 25 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L da solução “stop”. A leitura da densidade óptica foi feita em leitor de ELISA (Sunrise, Salzburg, Áustria) com filtro de 450 nm, imediatamente depois do término da reação. As concentrações de IL-8 foram determinadas pela comparação dos valores de densidade óptica das amostras testadas com aqueles de uma curva padrão construída a partir de concentrações diferentes das amostras padrão. Todas as amostras foram testadas em duplicata. Os níveis de IL-8 foram expressos como pg/mg de proteína total.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o programa estatístico SPSS, versão 10.0 (SPSS IN., Chicago, Illinois, EUA).

Diferenças entre crianças e adultos, bem como entre pacientes *H. pylori*-positivos e *H. pylori*-negativos, quanto às frequências dos polimorfismos foram avaliadas pelos testes bicaudais do Qui-quadrado ou exato de Fisher. Para avaliar a intensidade da associação foram calculados “odds ratio” (OR) e intervalos de confiança de 95%.

Os resultados das dosagens de citocinas foram apresentados como média \pm desvio padrão.

Os dados foram transformados logaritmicamente, pois de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov não apresentaram distribuição normal. Depois da transformação, os parâmetros apresentaram-se normalmente distribuídos ($p \geq 0,20$ no teste de Kolmogorov-Smirnov).

Para comparação dos níveis de citocinas entre os grupos de crianças e adultos *H. pylori*-negativos e *H. pylori*-positivos, grupos de pacientes colonizados por amostras com e sem os fatores de virulência bem como os grupos de adultos e crianças com os diferentes genótipos de *IL1B*, *IL1RN* e *TNFA* empregou-se o teste “t” de Student. De acordo com o polimorfismo do *IL1 RN*, os pacientes foram estratificados em dois grupos para análise, visto que a frequência do alelo 2/2 foi muito baixa. Assim, um grupo foi constituído de indivíduos com genótipo homozigoto selvagem (1/1) e o outro por aqueles apresentando perfil heterozigoto polimórfico (1/2) e homozigoto polimórfico (2/2). Em relação ao polimorfismo do gene *TNFA*, foram incluídos na análise apenas pacientes com perfil homozigoto selvagem (G/G) e heterozigoto polimórfico (G/A), uma vez que apenas um indivíduo tinha o genótipo homozigoto polimórfico. Correlação entre os níveis das citocinas na mucosa gástrica de

crianças e adultos, com e sem a infecção pelo *H. pylori* foi avaliada pelo teste de Correlação de Pearson. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

Equilíbrio de Hardy-Weimberg dos alelos foi avaliado pelo teste do qui-quadrado com 1 grau de liberdade. Desequilíbrio de ligação entre os locos foi estimado através do programa Genepop disponível no endereço eletrônico: wbiome.curtin.edu.au/chi-bin/genepop.cgi.

Tabela 1- Iniciadores e condições das reações de PCR para detecção de *ureA*, *DNAr 16S*, *cagA* e mosaïcismo de *vacA*

Gene Amplificado	Iniciadores	Temperatura, tempo e ciclos para PCR	Produto PCR (pb)
<i>ureA</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1992 F: 5'- GCC AAT GGT AAA TTA GTT - 3' R: 5'- CTC CTT AAT TGT TTT TAC - 3'	95°C-5 min.; 34 ciclos (94°C-1 min., 45°C-1 min. e 72°C-1 min.) e 72°C-5 min.	411
<i>DNAr 16S</i>	Fox <i>et al.</i> , 1998 F: 5'- CGT ATG ACG GGT ATC C - 3' R: 5'- GAT TTT ACC CCT ACA CCA - 3'	95°C-5 min.; 34 ciclos (94°C-1 min., 55°C-2 min. e 72°C-3 min.) e 72°C-5 min.	400
<i>cagA</i>	Peek <i>et al.</i> , 1995a F: 5'- GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G - 3' R: 5'- CTG CAA AAG ATT GTT TGC GAG A - 3'	95°C-5 min., 38 ciclos (94°C-1 min., 55°C-1 min. e 72°C-2min.) e 72°C-7 min.	349
	Kelly <i>et al.</i> , 1994 F: 5'- CTG CAA AAG ATT GTT TGC GAG A - 3' R: 5'- AGA CGG TTT GTT AGA AAA CGT C - 3'	95°C-5 min., 34 ciclos (95°C-1 min., 50°C-1 min. e 72°C-1min.) e 72°C-15 min.	400
<i>vacA</i>	Atherton <i>et al.</i> , 1995 s1		259
	s2 F: 5'- ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC - 3' R: 5'- CTG CTT GAA TGC GCC AAA C - 3'	95°C-5 min., 34 ciclos (95°C-1 min., 52°C-1 min. e 72°C-1 min.) e 72°C-15 min.	286
	m1 F: 5'- GTA ATG GTG GTT TCA ACA CC - 3' R: 5'- TAA TGA GAT CTT GAG CGC T - 3'		630
	m2 F: 5'- GGA GCC CCA GGA AAC ATT G - 3' R: 5'- CAT AAC TAG CGC CTT GCA C - 3'	95°C- 90 seg., 35 ciclos (95°C-30 seg., 56°C-1 min. e 72°C-90 seg.) e 72°C-5 min.	325

Tabela 2- Iniciadores e condições das reações de PCR para detecção de polimorfismos de *IL1B* na posição -31 e -511, *IL1RN*-VNTR e *TNFA* na posição -307

Polimorfismo	Iniciadores	Temperatura, tempo e ciclos de PCR
IL-1 β C para T na posição -511	F 5'-TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC-3' R 5'-GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT-3'	2 min à 95°C, 35 ciclos de 1 min à 95°C, 53°C, 74°C e 4 min à 74°C
IL-1 β T para C na posição -31	F1 5'-AAT GTG GAC ATC AAC TGC A-3' R1 5'-CTC CCT CGC TGT TTT TAT A-3' F2 5'-ACT TCT GCT TTT GAA AGC C-3' R2 5'-TCA GCT GTT AGA TAA GCA G-3'	5 min à 94°C, 30 ciclos de 1 min à 94°C, 54°C, 72°C e 5 min à 72°C
IL-1RN 86 pb VNTR intron2	F 5'-CTC AGC AAC ACT CCT AT-3' R 5'-TCC TGG TCT GCA GGT AA-3'	1 min à 96°C, 30 ciclos de 1 min à 94°C, 60°C, 70°C e 4 min à 72°C
TNF α G para A na posição -308	F 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' R 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3'	3 min à 94°C, 35 ciclos de 1 min à 94°C, 60°C, 72°C e 4 min à 72°C

4. RESULTADOS

4.1. POPULAÇÃO

Cento e quarenta e três crianças e 143 adultos foram incluídos no estudo. Dentre as crianças, 76 eram *Helicobacter pylori*-negativas e 67 *Helicobacter pylori*-positivas (sem úlcera duodenal e com gastrite confirmada à histologia). Quarenta e dois adultos eram *Helicobacter pylori*-negativos e 101 *Helicobacter pylori*-positivos (sem úlcera péptica e câncer gástrico e com gastrite comprovada à histologia) (tabela 3).

Tabela 3 – Características da população estudada

Pacientes	N	Feminino/ Masculino	Idade (anos)	
			Média ± DP	Faixa etária
Crianças				
<i>H. pylori</i> -positivas*	67	38/29	9,9 ± 3,3	2 - 18
<i>H. pylori</i> -negativas	76	43/33	8,4 ± 3,4	1 - 18
Adultos				
<i>H. pylori</i> -positivos*	101	39/62	52,7 ± 16,3	19 - 74
<i>H. pylori</i> -negativos	42	21/21	43,4 ± 15,7	19 - 87

N, número; DP, desvio padrão; * com gastrite à histologia, sem úlcera péptica ou câncer gástrico

4.2. DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA DO *H. pylori* *cagA* e *vacA*

4.2.1 *cagA*

cagA estava presente em 47,8% (32/67) das amostras isoladas de crianças e em 53,3% (54/101) das amostras isoladas de adultos.

4.2.2. *vacA*

A detecção dos genótipos de *vacA* foi possível em 64 (95,5%) amostras isoladas das crianças. Infecção mista, determinada pela presença simultânea dos genótipos s1 e s2 e/ou m1 e m2, ocorreu em 10,9% (7/64), não tendo sido incluídas na análise estatística as crianças infectadas por mais de uma amostra. Assim, genótipos de *vacA* s1 e s2 estavam presentes em 29 (50,9%) e 28 (49,1%) amostras respectivamente e m1 e m2 em 20 (35,1%) e 37 (64,9%) amostras respectivamente (tabela 4).

Nos adultos, a detecção dos genótipos foi possível em 90 (89,1%) amostras. Presença simultânea de genótipos ocorreu em 23 casos (25,5%) que não foram incluídos na análise estatística. Nas 67 amostras consideradas na análise, s1 foi detectado em 35 (52,2%) e s2 em 32 (47,8 %) bem como m1 em 23 (34,3 %) e m2 em 44 (65,7%) amostras (tabela 4).

Infecção mista foi mais freqüentemente observada nos adultos que nas crianças ($p = 0,04$; OR = 2,80; IC = 95% 1,04 – 7,78).

Tabela 4 - Genótipos de *vacA* nas amostras de *H. pylori* isoladas de crianças e adultos

Genótipos de <i>vacA</i>	Crianças N (%)	Adultos N (%)
s1m1	20 (29,9)	24 (23,7)
s1m2	9 (13,4)	13 (12,9)
s2m2	28 (41,8)	30 (29,7)
mistos	7 (10,4)	23 (22,8)
não tipável	3 (4,5)	11 (10,9)
Total	67 (100)	101 (100)

N, número

4.3. POLIMORFISMOS NOS GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS

A frequência dos genótipos de *IL1B* na posição -31 e -511, *IL1RN* VNTR e *TNFA* na posição -307 nas crianças e adultos com e sem a infecção pelo *H. pylori* está listada na tabela 5. Os alelos encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada. Como os alelos *IL1B*-511 e *IL1B*-31 estavam em quase completo e inverso desequilíbrio de ligação em todos os grupos analisados, só foram avaliados os na posição -31.

Tabela 5 - Frequência dos genótipos de *IL1B*-31 e -511, *IL1RN* VNTR e *TNFA*-307 em crianças e adultos *H. pylori*-negativos e *H. pylori*-positivos

Genótipo	Crianças		Adultos	
	HP- (N = 76)	HP+ (N = 67)	HP- (N = 42)	HP+ (N = 101)
<i>IL1B-31</i>				
T/T	26 (34,2%)	21 (31,3%)	17 (40,5%)	39 (38,6%)
T/C	36 (47,4%)	33 (49,3%)	20 (47,6%)	42 (41,6%)
C/C	14 (18,4%)	13 (19,4%)	5 (11,9%)	20 (19,8%)
<i>IL1B-511</i>				
C/C	27 (35,5%)	22 (32,8%)	18 (42,9%)	41 (40,6%)
C/T	35 (46,1%)	34 (50,7%)	21 (50%)	40 (39,6%)
T/T	14 (18,4%)	11 (16,4%)	3 (7,1%)	20 (19,8%)
<i>IL1RN</i>				
1/1	47 (61,8%)	48 (71,6%)	31 (73,8%)	61 (60,4%)
1/2	25 (32,9%)	15 (22,4%)	10 (23,8%)	34 (33,7%)
2/2	4 (5,3%)	4 (6%)	1 (2,4%)	6 (5,9%)
<i>TNFA</i>				
G/G	59 (77,6%)	49 (73,1%)	33 (78,6%)	81 (80,2%)
G/A	17 (22,4%)	18 (26,9%)	8 (19,0%)	20 (19,20%)
A/A	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,4%)	0 (0%)

N, número; HP-, *H. pylori*-negativo; HP+, *H. pylori*-positivo

Não foram vistas diferenças significativas, quanto à frequência dos genótipos de *IL1B* na posição -31 e -511, *IL1RN* VNTR e *TNFA* na posição -307, quando crianças ou adultos *H. pylori*-negativos foram comparados com os respectivos grupos *H. pylori*-positivos bem como quando crianças foram comparadas com adultos ($p > 0,18$).

4.4. NÍVEIS DE CITOCINAS NA MUCOSA GÁSTRICA DE CRIANÇAS E ADULTOS *H. pylori*-NEGATIVOS E -POSITIVOS

Os níveis médios de IL-1 β , IL-1 α , IL8 e TNF- α foram significativamente maiores ($p < 0,001$) na mucosa gástrica de crianças *H. pylori*-positivas que daquelas *H. pylori*-negativas (tabela 6, figura 5). No grupo de crianças não infectadas, observou-se forte correlação positiva entre as concentrações gástricas de IL-1 α e TNF- α ($r = 0,90$; $p = 0,006$). Nas demais comparações entre as concentrações gástricas de citocinas nas crianças *H. pylori*-negativas, não foram observadas correlações significativas (IL-1 β x IL-8, $p = 0,34$; IL-1 β x IL-1 α , $p = 0,90$; IL-1 β x TNF- α , $p = 0,69$; IL-1 α x IL-8, $p = 0,90$), embora tenha ocorrido tendência de correlação entre IL-8 e TNF- α ($p = 0,06$). Nas crianças infectadas, observou-se fraca correlação positiva entre os níveis de IL- α e IL-8 ($r = 0,28$; $p = 0,02$), bem como entre os níveis de IL-1 α e TNF- α ($r = 0,21$; $p = 0,05$). Nos outros cruzamentos entre os níveis gástricos de citocinas nas crianças infectadas, não foram observadas correlações significativas (IL-1 β x IL-8, $p = 0,30$; IL-1 β x IL-1 α , $p = 0,63$; IL-1 β x TNF- α , $p = 0,32$; IL-8 x TNF- α , $p = 0,59$).

Tabela 6 – Níveis médios de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de crianças *H. pylori*-negativas e -positivas

Concentração média \pm DP de citocinas (pg/mg)	Crianças		p	Aumento em número de vezes
	HP-negativas (N = 76)	HP-positivas (N = 67)		
IL-1 β	17,58 \pm 38,85	147,90 \pm 108,70	< 0,001	8,4
IL-1 α	50,58 \pm 38,85	266,94 \pm 158,81	< 0,001	5,3
IL-8	19,99 \pm 28,05	1072,00 \pm 1508,96	< 0,001	53,9
TNF- α	6,88 \pm 17,92	929,40 \pm 230,89	< 0,001	134,7

N, número; DP, desvio padrão; HP, *H. pylori*

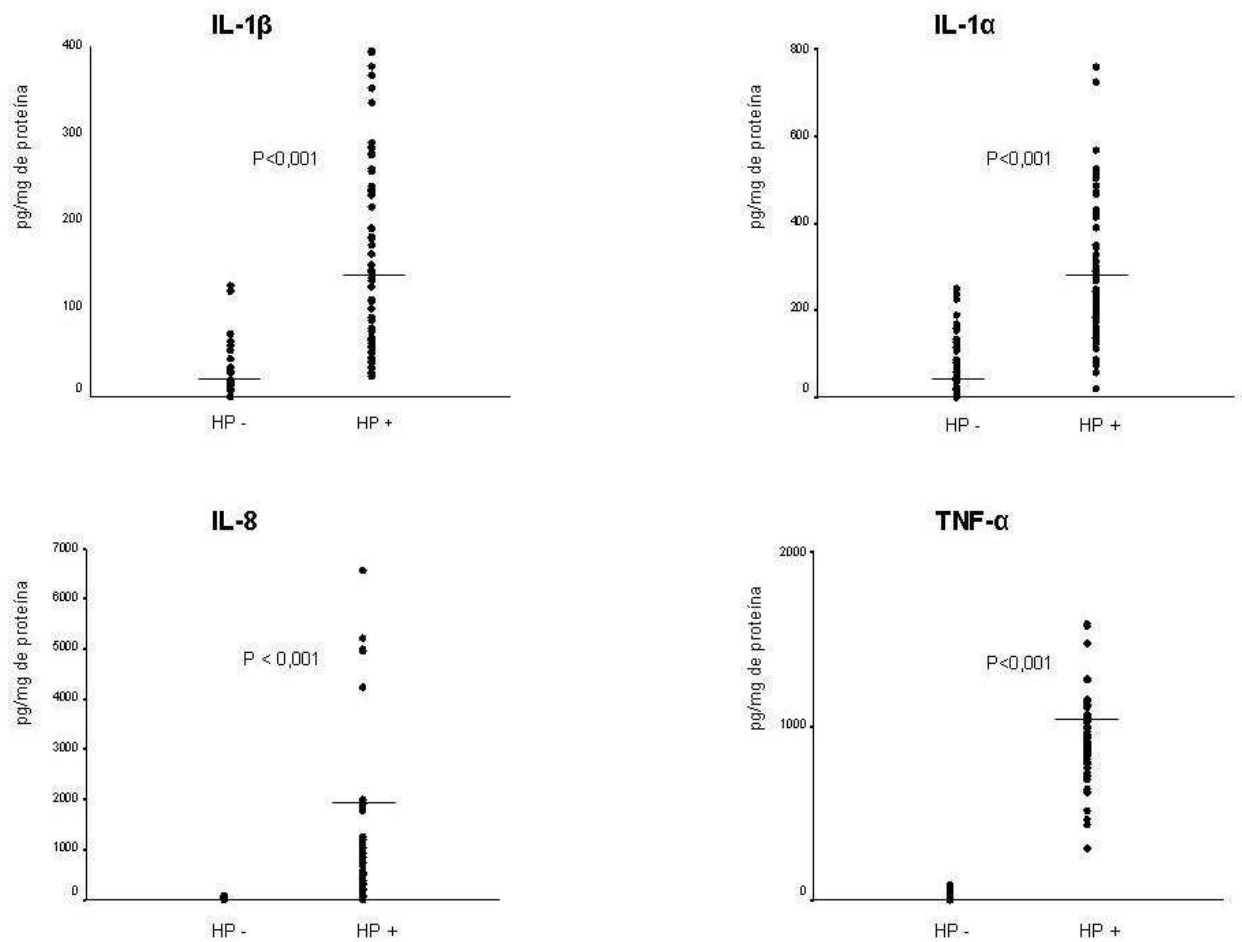


Figura 5 - Concentração de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de crianças HP- (*H. pylori*-negativas) (N = 76) e HP+ (*H. pylori*-positivas) (N = 67).

Nos adultos, os níveis médios de IL-1 β , IL-1 α , IL8 e TNF- α foram significativamente maiores na mucosa gástrica dos pacientes infectados pelo *H. pylori* que dos não infectados (tabela 7, figura 6). No grupo de adultos não infectados, observou-se fraca correlação positiva entre os níveis de IL-1 β e IL-1 α ($r = 0,29$; $p = 0,05$). Nas demais comparações entre os níveis das diferentes citocinas no grupo *H. pylori*-negativo, não foram vistas correlações (IL-1 β x IL-8, $p = 0,58$; IL-1 β x TNF- α , $p = 0,41$; IL-1 α x IL-8, $p = 0,97$; IL-1 α x TNF- α , $p = 0,50$; IL-8 x TNF- α , $p = 0,57$). No grupo infectado, observou-se forte correlação positiva entre os

níveis de IL-1 α e IL-1 β ($r = 0,55$, $p < 0,001$) (figura 7), bem como fraca correlação positiva entre os níveis de IL-1 α e TNF- α ($r = 0,32$ e $p = 0,003$) e os níveis de IL-1 β e TNF- α ($r = 0,22$ e $p = 0,05$). Nas demais comparações entre os níveis gástricos de citocinas dos adultos infectados, não houve correlação significativa (IL-1 β x IL-8, $p = 0,70$; IL-1 α x IL-8, $p = 0,22$; IL-8 x TNF- α , $p = 0,43$).

Tabela 7 – Níveis médios de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de adultos *H. pylori*-negativos e -positivos

Concentração média \pm DP de citocinas (pg/mg)	Adultos		p	Aumento em número de vezes
	HP-negativos (N = 42)	HP-positivos (N = 101)		
IL-1 β	226,98 \pm 109,76	295,14 \pm 166,81	0,009	1,3
IL-1 α	70,31 \pm 42,55	122,91 \pm 62,73	< 0,001	1,8
IL-8	40,12 \pm 42,75	1395,65 \pm 2040,16	< 0,001	34,8
TNF- α	45,29 \pm 50,99	235,2 \pm 186,04	< 0,001	5,2

N, número; DP, desvio padrão; HP, *H. pylori*

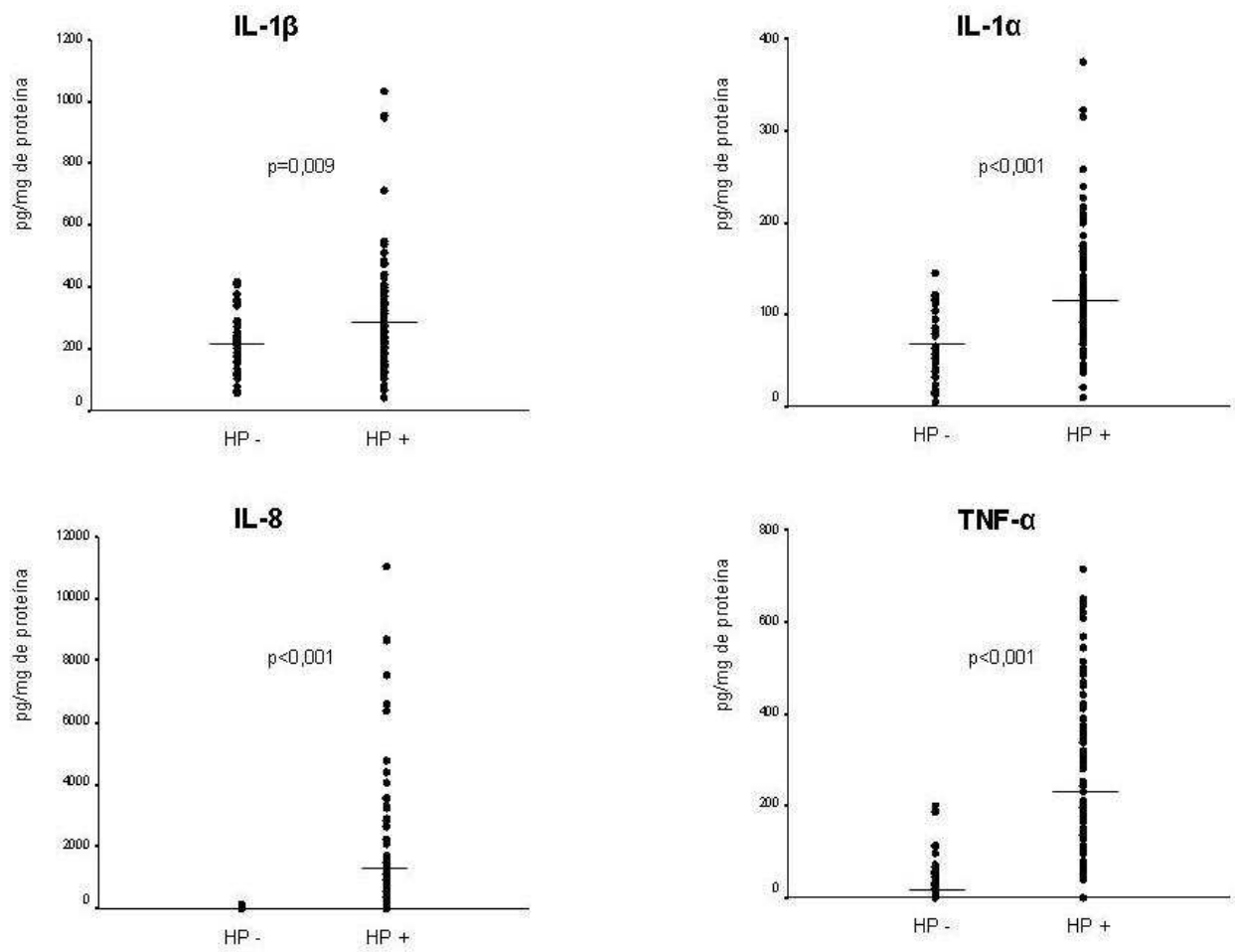


Figura 6 - Níveis de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de adultos HP- (*H. pylori*-negativos) (N = 42) e HP+ (*H. pylori*-positivos) (N = 101).

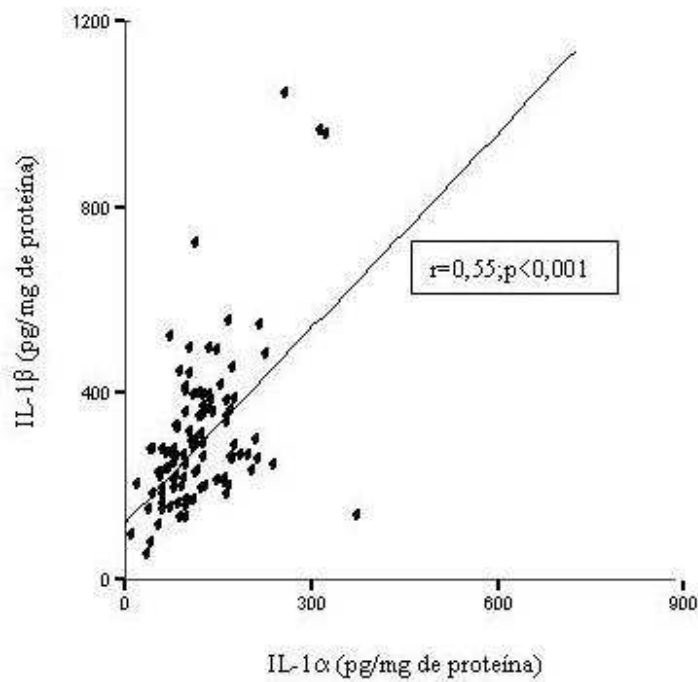


Figura 7 – Correlação entre os níveis gástricos de IL-1 β e IL-1 α em adultos infectados pelo *H. pylori*

4.4.1. COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CITOCINAS NA MUCOSA GÁSTRICA DE CRIANÇAS E ADULTOS

Entre os pacientes *H. pylori*-negativos, os níveis médios de IL-1 β na mucosa gástrica foram significativamente maiores ($p < 0,001$) nos adultos que nas crianças (figura 8); entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos níveis de IL-1 α ($p = 0,25$), IL-8 ($p = 0,85$) e TNF- α ($p = 0,32$).

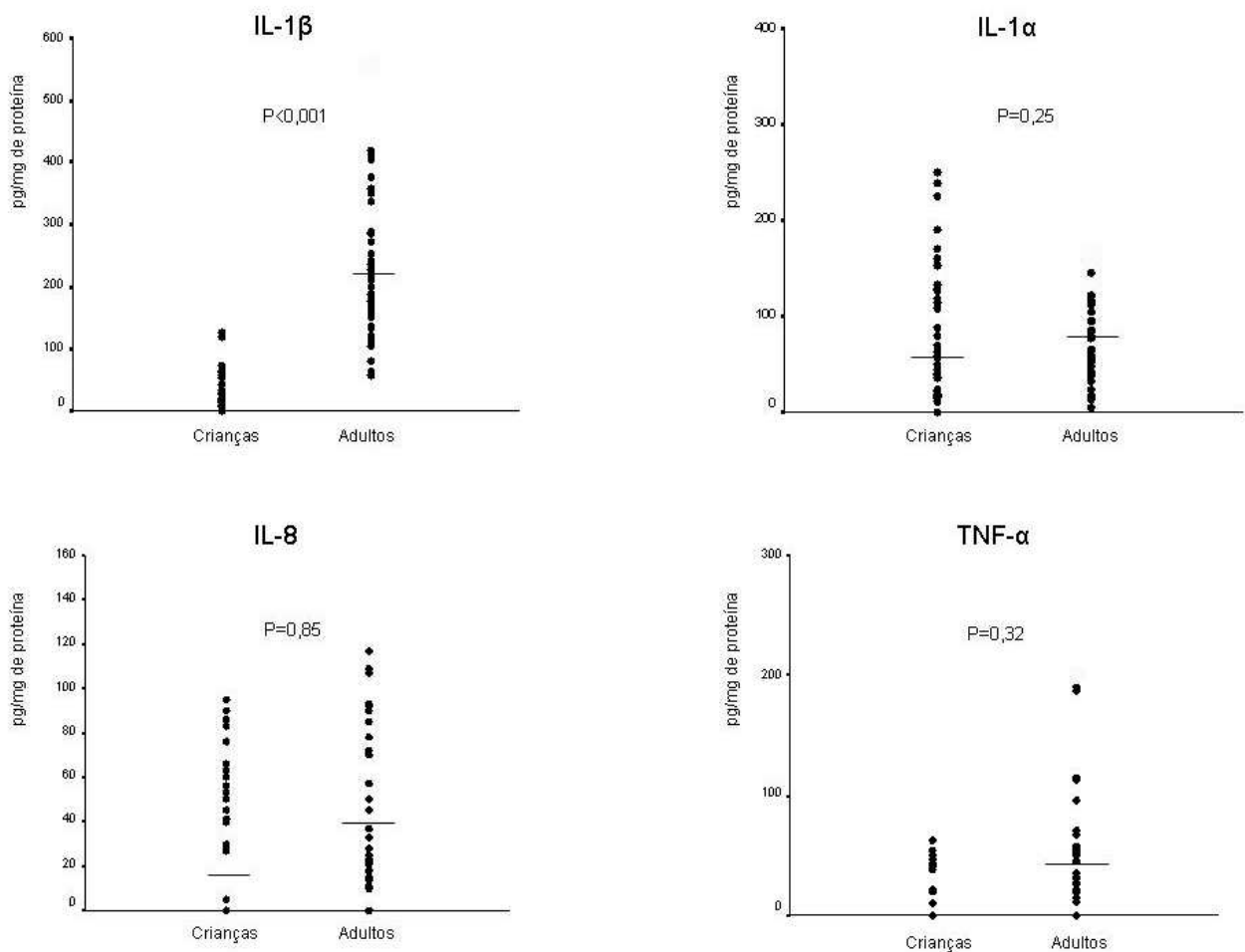


Figura 8 – Comparação entre os níveis de IL-1 β (A), IL-1 α (B), IL-8 (C) e TNF- α (D) na mucosa gástrica de adultos (N = 42) e crianças (N = 76) *H. pylori*-negativos

Quando os grupos de pacientes *H. pylori*-positivos foram comparados entre si, os níveis gástricos de IL-1 α e TNF- α foram significativamente maiores ($p < 0,001$) nas crianças que nos adultos, mas os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores ($p < 0,001$) na mucosa gástrica dos adultos que das crianças. Embora as concentrações de IL-8 na mucosa gástrica tenham sido maiores nos adultos que nas crianças, as diferenças não foram significativas ($p = 0,09$) (figura 9). Quando os pacientes infectados foram estratificados de

acordo com o status *cagA*, no grupo *cagA*-positivo não houve diferença ($p = 0,54$) entre os níveis gástricos de IL-8 de adultos ($2272,00 \pm 2397,69$ pg/mg) e crianças ($1993,00 \pm 1764,11$ pg/mg).

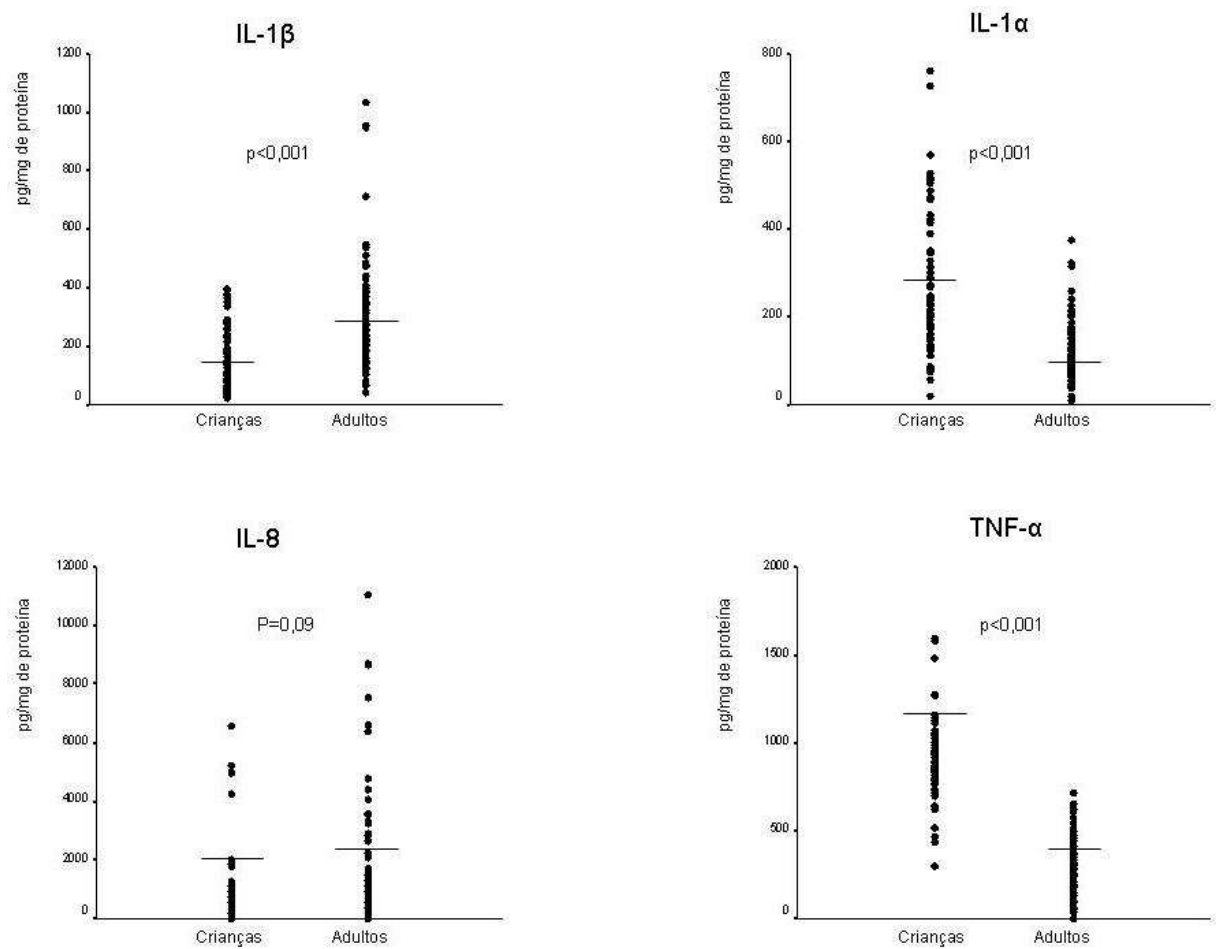


Figura 9 – Comparação entre os níveis de IL-1 β (A), IL-1 α (B), IL-8 (C) e TNF- α (D) na mucosa gástrica de adultos (N = 101) e crianças (N = 67) infectados pelo *H. pylori*

4.5. NÍVEIS DE CITOCINAS NA MUCOSA GÁSTRICA DE CRIANÇAS E ADULTOS COLONIZADOS POR AMOSTRAS *cagA*-POSITIVAS OU -NEGATIVAS

Os níveis médios de IL-8 na mucosa gástrica das crianças infectadas por amostras de *H. pylori cagA*-positivas ($1993,00 \pm 1764,11$ pg/mg) foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que os observados na mucosa gástrica de crianças infectadas por amostras *cagA*-

negativas ($236,78 \pm 40,02$ pg/mg) (figura 10). Os níveis de IL-1 β ($cagA^+ = 165,22 \pm 114,96$ pg/mg; $cagA^- = 132,06 \pm 101,77$ pg/mg; $p = 0,21$), IL-1 α ($cagA^+ = 266,31 \pm 167,57$ pg/mg; $cagA^- = 267,51, \pm 152,82$ pg/mg; $p = 0,71$) e TNF- α ($cagA^+ = 885,53 \pm 274,74$ pg/mg; $cagA^- = 969,51 \pm 176,61$ pg/mg; $p = 0,15$) não diferiram entre os grupos.

Os níveis médios de IL-8 foram significativamente maiores na mucosa gástrica de adultos infectados por amostras *cagA*-positivas ($2272,00 \pm 2397,69$ pg/mg) que dos infectados por amostras *cagA*-negativas ($388,79 \pm 698,01$ pg/mg) (figura 10). Não foram vistas diferenças nos níveis de IL-1 β ($cagA^+ = 311,07 \pm 205,87$ pg/mg; $cagA^- = 276,83 \pm 104,96$ pg/mg; $p = 0,92$), IL-1 α ($cagA^+ = 129,07 \pm 72,21$ pg/mg; $cagA^- = 115,83 \pm 49,52$ pg/mg; $p = 0,75$) e TNF- α ($cagA^+ = 215,76 \pm 185,37$ pg/mg; $cagA^- = 257,57 \pm 186,27$ pg/mg; $p = 0,83$) entre os grupos.

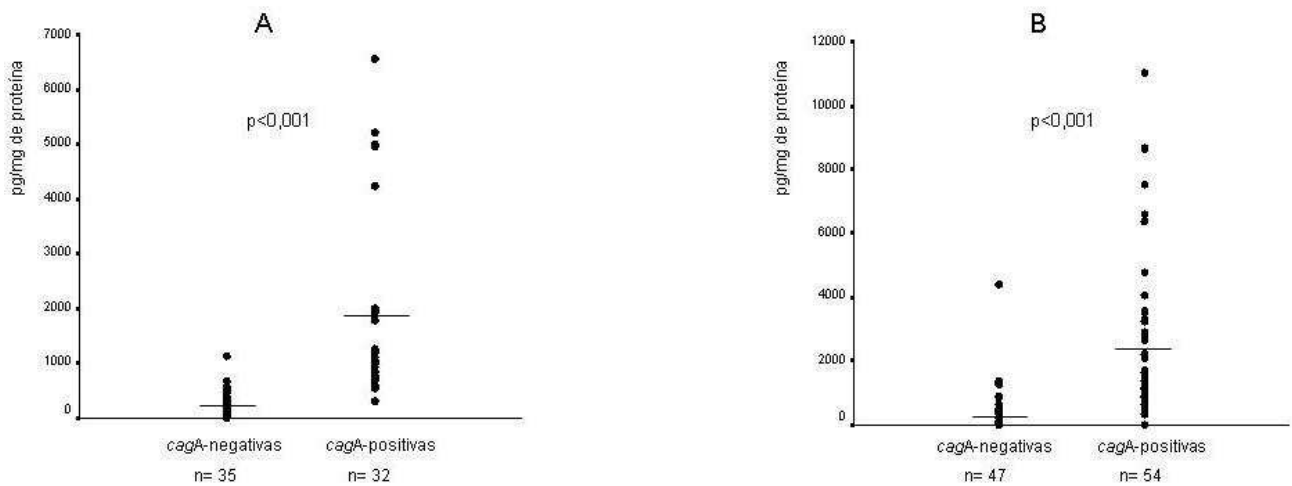


Figura 10- Níveis de IL-8 na mucosa gástrica de crianças (A) e adultos (B) infectados por amostras de *H. pylori* *cagA*-negativas e -positivas

4.6. NÍVEIS DE CITOCINAS NA MUCOSA GÁSTRICA DE CRIANÇAS E ADULTOS COLONIZADOS POR AMOSTRAS COM DIFERENTES GENÓTIPOS DE *vacA*

Os níveis médios de IL-8 foram significativamente maiores ($p = 0,001$) na mucosa gástrica de crianças infectadas por amostras s1 ($1454,00 \pm 1658,31$ pg/mg) que nas infectadas por amostras s2 ($576,11 \pm 963,47$ pg/mg) (figura 11). No que se refere às concentrações das demais citocinas na mucosa gástrica, não foram observadas diferenças entre os genótipos s de *vacA* (IL-1 β : s1 = $160,14 \pm 102,20$ pg/mg, s2 = $142,64 \pm 120,66$ pg/mg, $p = 0,21$; IL-1 α : s1 = $287,48 \pm 158,70$ pg/mg, s2 = $226,43 \pm 125,82$ pg/mg, $p = 0,11$; TNF- α : s1 = $933,38 \pm 274,56$ pg/mg, s2 = $906,68 \pm 219,07$ pg/mg, $p = 0,59$).

Os níveis médios de IL-8 foram significativamente maiores ($p = 0,006$) na mucosa gástrica de crianças infectadas por amostras m1 ($1083,00 \pm 9132,41$ pg/mg) que nas infectadas por amostras m2 ($989,95 \pm 1636,48$ pg/mg) (figura 11). Não houve diferenças entre os níveis médios de IL-1 β (m1 = $162,00 \pm 115,03$ pg/mg; m2 = $145,89 \pm 109,94$ pg/mg; $p = 0,48$), IL-1 α (m1 = $286,05 \pm 172,03$ pg/mg; m2 = $242,05 \pm 128,91$ pg/mg; $p = 0,39$) e TNF- α (m1 = $932,05 \pm 233,18$ pg/mg; m2 = $898,45 \pm 181,07$ pg/mg; $p = 0,69$) quando crianças colonizadas por amostras m1 foram comparadas com aquelas colonizadas por amostras m2.

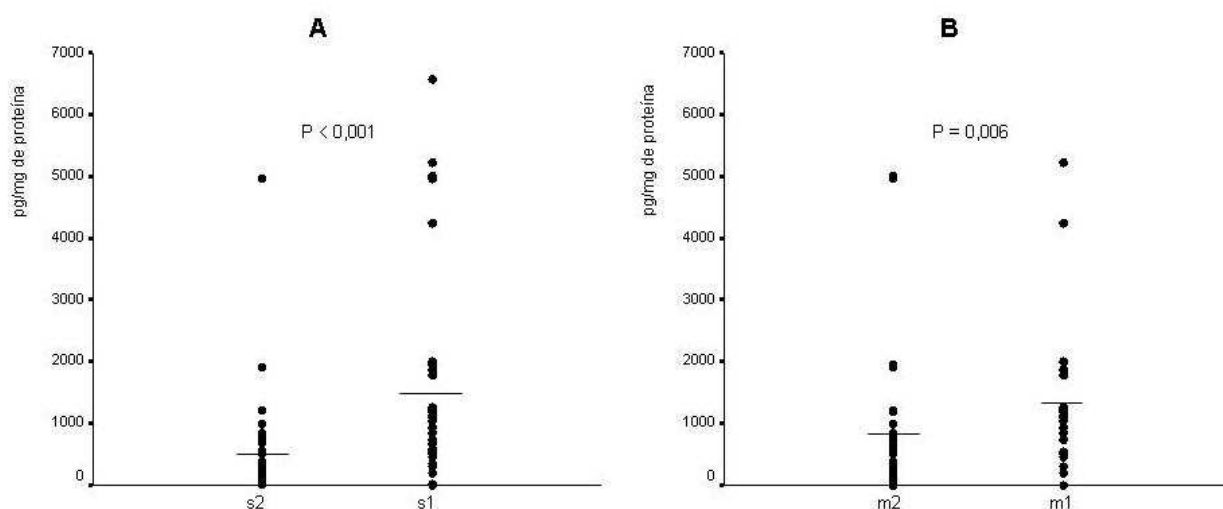


Figura 11- Níveis de IL-8 na mucosa gástrica de crianças infectadas por amostras de *H. pylori* s2 (N = 28) e s1 (N = 29) (A) e m2 (N = 37) e m1 (N = 20) (B) de *vacA*

Os níveis médios de IL-8 foram significativamente maiores ($p < 0,001$) na mucosa gástrica de crianças infectadas por amostras s1m1 ($1083,45 \pm 932,41$ pg/mg) que nas infectadas por amostras s2m2 ($576,11 \pm 963,47$ pg/mg). Não houve diferenças entre os níveis médios de IL-1 β (s1m1 = $162,00 \pm 115,03$ pg/mg; s2m2 = $142,64 \pm 120,66$ pg/mg; $p = 0,32$), IL-1 α (s1m1 = $286,05 \pm 172,03$ pg/mg; s2m2 = $226,43 \pm 125,82$ pg/mg; $p = 0,22$) e TNF- α (s1m1 = $898,45 \pm 181,07$ pg/mg; s2m2 = $906,68 \pm 219,07$ pg/mg; $p = 0,98$) entre os genótipos s1m1 e s2m2 de *vacA*.

Não houve diferenças significativas nos níveis gástricos de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α quando crianças com infecção por uma amostra foram comparadas com crianças com infecção mista ($p = 0,34$; $p = 0,41$; $p = 0,88$ e $p = 0,78$, respectivamente).

Os níveis médios de IL-8 foram significativamente maiores ($p < 0,001$) na mucosa gástrica de adultos infectados por amostras s1 ($1753,60 \pm 1914,28$ pg/mg) que nos infectados

por amostras s2 ($871,31 \pm 1634,96$ pg/mg) (figura 12). Os grupos não diferiram quanto aos níveis médios de IL-1 β (s1 = $285,60 \pm 207,60$ pg/mg; s2 = $292,91 \pm 104,28$ pg/mg; p = 0,23), IL-1 α (s1 = $124,54 \pm 61,33$ pg/mg; s2 = $113,50 \pm 50,47$ pg/mg; p = 0,56) e TNF- α (s1 = $180,77 \pm 148,37$ pg/mg; s2 = $237,97 \pm 186,00$ pg/mg; p = 0,28).

Os níveis médios de IL-8 foram significativamente maiores (p = 0,02) na mucosa gástrica de adultos infectados por amostras m1 ($1767,70 \pm 1955,29$ pg/mg) que nos infectados por amostras m2 ($1104,57 \pm 1736,87$ pg/mg) (figura 12). Não houve diferenças entre os níveis médios de IL-1 β (m1 = $279,48 \pm 188,16$ pg/mg; m2 = $294,11 \pm 154,11$ pg/mg; p = 0,49), IL-1 α (m1 = $126,04 \pm 62,42$ pg/mg; m2 = $115,73 \pm 53,17$ pg/mg; p = 0,53) e TNF- α (m1 = $217,00 \pm 151,92$ pg/mg; m2 = $203,43 \pm 178,18$ pg/mg; p = 0,84) entre os grupos.

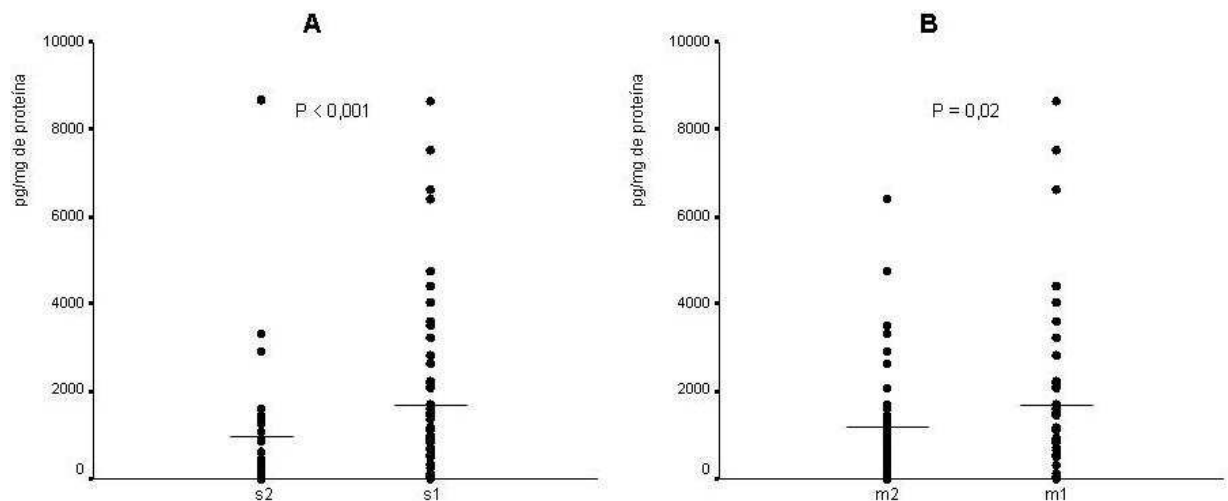


Figura 12- Níveis de IL-8 na mucosa gástrica de adultos infectados por amostras s2 (N = 28) e s1 (N = 29) (A) e m2 (N = 37) e m1 (N = 20) (B) de *vacA*

As concentrações gástricas de IL-8 foram significativamente maiores (p = 0,003) nos adultos infectados por amostras s1m1 ($1694,04 \pm 1946,06$ pg/mg) quando comparados com

aqueles colonizados por amostras s2m2 ($881,00 \pm 1679,15$ pg/mg). Não houve diferenças entre as concentrações médias de IL-1 β (s1m1 = $278,25 \pm 184,12$ pg/mg; s2m2 = $294,90 \pm 107,46$ pg/mg; $p = 0,28$), IL-1 α (s1m1 = $124,21 \pm 61,71$ pg/mg; s2m2 = $114,53 \pm 51,84$ pg/mg; $p = 0,59$) e TNF- α (s1m1 = $213,88 \pm 149,36$ pg/mg; s2m2 = $249,10 \pm 185,97$ pg/mg; $p = 0,44$) quando os dois grupos foram comparados.

Não houve diferenças significativas nos níveis médios de IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α na mucosa gástrica de adultos com infecção por uma amostra da bactéria quando comparados com pacientes com infecção mista ($p = 0,25$; $p = 0,66$; $p = 0,53$ e $p = 0,39$, respectivamente).

Como é comum o fato de que amostras *cagA*-positivas sejam também s1, para avaliar se a associação observada entre níveis de IL-8 e genótipos *vacA* não se deviam ao gene *cagA*, os pacientes foram estratificados com base no “status” *cagA*. No subgrupo *cagA*-positivo não foram observadas diferenças significativas entre os níveis médios de IL-8 na mucosa gástrica tanto de crianças (s1, $p = 0,48$; m1, $p = 0,25$; s1m1, $p = 0,95$), quanto de adultos (s1, $p = 0,28$; m1, $p = 0,84$; s1m1, $p = 0,31$) colonizados pelos diferentes genótipos de *vacA*. No subgrupo *cagA*-negativo não foram observadas diferenças significativas entre os níveis médios de IL-8 na mucosa gástrica tanto de crianças (s1, $p = 0,31$; m1, $p = 0,35$; s1m1, $p = 0,36$), quanto de adultos (s1, $p = 0,56$; m1, $p = 0,21$; s1m1, $p = 0,23$) colonizados pelos diferentes genótipos de *vacA*.

4.7. POLIMORFISMOS NOS GENES QUE CODIFICAM CITOCINAS E CONCENTRAÇÃO GÁSTRICA DE CITOCINAS

4.7.1. PACIENTES *H. pylori*-NEGATIVOS

4.7.1.1. *IL1B*-31

Não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,63$) entre os níveis de IL-1 β na mucosa gástrica de crianças com o genótipo homozigoto selvagem T/T ($140,4 \pm 113,11$ pg/mg) e homozigoto polimórfico C/C ($160,00 \pm 112,98$ pg/mg) do *IL1B* na posição -31. Também não houve diferenças significativas ($p = 0,71$) nos níveis de IL-1 β quando comparadas crianças com o genótipo homozigoto selvagem e heterozigoto T/C ($147,68 \pm 107,4$ pg/mg).

Os níveis de IL-1 β na mucosa gástrica dos adultos com genótipo T/T ($224,24 \pm 108,62$ pg/mg) não diferiram significativamente ($p = 0,99$) dos observados na mucosa gástrica daqueles com o genótipo C/C ($215,06 \pm 93,49$ pg/mg). Quando comparados indivíduos com o genótipo T/T e T/C ($232,15 \pm 118,97$ pg/mg), também, não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,80$) entre os níveis de IL-1 β .

4.7.1.2. *IL1RN*

Não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,65$) entre os níveis médios de IL-1 β na mucosa gástrica de crianças com o genótipo 1/1 ($21,19 \pm 45,44$ pg/mg) e a soma de genótipos polimórficos 1/2 e 2/2 ($13,60 \pm 25,81$ pg/mg) do *IL1RN*. Também, não houve diferenças significativas ($p = 0,22$) entre os níveis médios de IL-1 α entre os diferentes genótipos (1/1, $53,49 \pm 87,31$ pg/mg; 1/2 + 2/2, $46,48 \pm 63,4$ pg/mg).

Na população adulta, os níveis médios de IL-1 β ($p = 0,55$) e IL-1 α ($p = 0,51$) foram semelhantes entre pacientes com genótipo selvagem ($222,61 \pm 118,56$ pg/mg, $72,26 \pm 43,34$

pg/mg, respectivamente) e polimórfico ($237,80 \pm 88,07$ pg/mg, $62,70 \pm 43,36$ pg/mg, respectivamente).

4.7.1.3. TNFA

Tanto nas crianças (G/G = $6,19 \pm 16,29$ pg/mg; G/A = $9,29 \pm 23,15$ pg/mg; $p = 0,44$) quanto nos adultos (G/G = $45,13 \pm 50,74$ pg/mg; G/A = $33,50 \pm 19,62$ pg/mg; $p = 0,19$), os níveis gástricos de TNF- α não diferiram entre os grupos com genótipo selvagem ou polimórfico.

4.7.2. PACIENTES *H. pylori*-POSITIVOS

3.7.2.1. *IL1B*-31

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis gástricos de IL-1 β entre as crianças com o genótipo homozigoto selvagem T/T ($152,38 \pm 123,16$ pg/mg) e polimórfico C/C ($160,00 \pm 112,98$ pg/mg; $p = 0,67$), bem como com o genótipo homozigoto selvagem e heterozigoto T/C ($140,27 \pm 99,91$ pg/mg; $p = 0,97$).

Na população adulta, os níveis gástricos de IL-1 β não diferiram entre os pacientes com genótipo T/T ($296,02 \pm 170,30$ pg/mg) e C/C ($332,10 \pm 200,54$ pg/mg; $p = 0,47$), bem como T/T e T/C ($276,20 \pm 145,37$ pg/mg; $p = 0,65$).

3.7.2.2. *IL1RN*

Não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,15$) entre os níveis médios de IL-1 β na mucosa gástrica de crianças com o genótipo 1/1 ($143,04 \pm 102,49$ pg/mg) e soma dos genótipos polimórficos 1/2 e 2/2 ($188,13 \pm 126,70$ pg/mg) do *IL1RN*. Também não houve diferenças significativas ($p = 0,41$) entre os níveis médios de IL-1 α entre os diferentes genótipos (1/1 = $260,06 \pm 168,13$ pg/mg; 1/2 e 2/2 = $285,80 \pm 150,34$ pg/mg).

Na população adulta, as concentrações gástricas de IL-1 β foram significativamente maiores ($p = 0,02$) nos pacientes com genótipos polimórficos ($349,24 \pm 198,15$ pg/mg) que naqueles com genótipo selvagem ($270,26 \pm 145,51$ pg/mg) (figura 13). Não houve diferenças significativas ($p = 0,35$) nos níveis de IL-1 α entre os genótipos selvagem ($122,10 \pm 65,52$ pg/mg) e polimórficos ($127,09 \pm 59,10$ pg/mg).

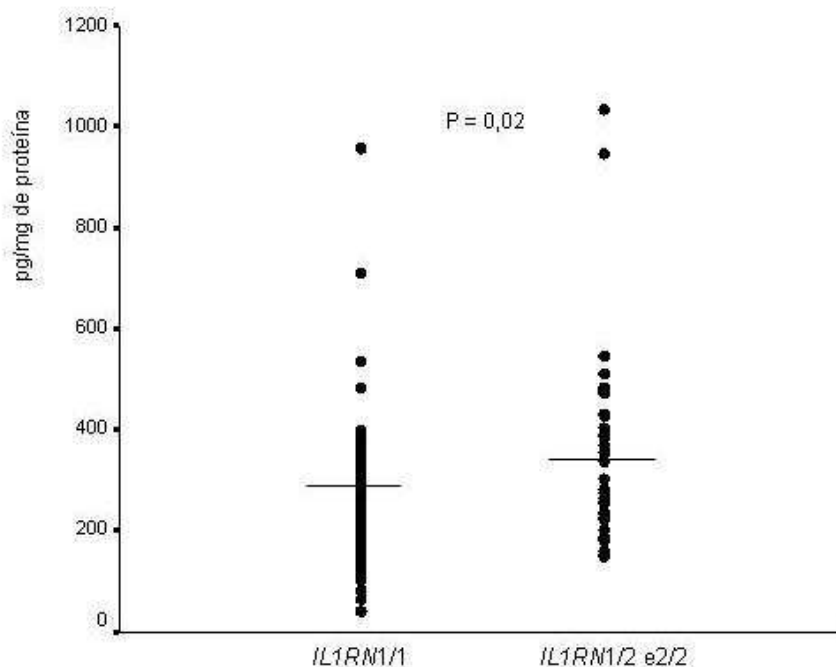


Figura 13 – Comparação entre os níveis de IL-1 β na mucosa gástrica de adultos *H. pylori*-positivos com os genótipos selvagem (1/1) e polimórficos (1/2 e 2/2) do *ILRN*

3.7.2.3. TNFA

Quando se compararam crianças com genótipo homozigoto selvagem G/G ($912,86 \pm 231,33$ pg/mg) e heterozigoto G/A ($972,44 \pm 230,70$ pg/mg), não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,24$) nos níveis gástricos de TNF- α .

As concentrações gástricas de TNF- α foram semelhantes ($p = 0,85$) entre os adultos com genótipo homozigoto selvagem ($231,97 \pm 180,23$ pg/mg) e heterozigoto ($248,55 \pm 212,49$ pg/mg).

5. DISCUSSÃO

Estudos objetivando compreender o perfil de expressão de citocinas na mucosa gástrica durante a vigência da infecção pelo *H. pylori*, bem como avaliando se polimorfismos em regiões promotoras dos genes que codificam citocinas estão associados a diferenças quantitativas de expressão das citocinas, muitas vezes, apresentam resultados conflitantes. Essas divergências podem ser explicadas de várias maneiras, tais como por diferenças de origem étnica e regional entre as populações estudadas, tamanho dos grupos avaliados e presença de pacientes com diferentes doenças do trato digestivo superior no grupo dos infectados pela bactéria. Deve-se salientar, também, que em alguns trabalhos, o diagnóstico da infecção não foi feito da forma mais adequada, ou seja, usando vários métodos para aumentar a acurácia, visto que o microrganismo não se distribui uniformemente na mucosa gástrica. O presente estudo avaliou um número grande de pacientes, tanto crianças quanto adultos, *H. pylori*-negativos e -positivos. Ainda, o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, foi obtido pelo uso de vários testes, evitando assim a ocorrência de resultados “falso-negativos” ou “falso-positivos”. Vale destacar, o fato de terem sido estabelecidos critérios de inclusão e exclusão de pacientes com rigor, visando excluir vieses.

No presente estudo, os níveis médios de IL-1 β , IL-8 e TNF- α foram significativamente maiores na mucosa gástrica de crianças e adultos infectados pelo *H. pylori* que naqueles *H. pylori*-negativos, confirmando resultados observados em outras populações (Noach *et al.*, 1994; Peek *et al.*, 1995b; Yamaoka *et al.*, 1997; Katagiri *et al.*, 1997; Kutukculer *et al.*; 1997; Guiraldes *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que além desse ter sido o primeiro estudo que avaliou a expressão de IL-1 α na mucosa gástrica de crianças infectadas ou não pelo *H. pylori*, como já mencionado, foi grande o número de crianças incluídas, o que reforça a importância dos dados. Os níveis gástricos da citocina foram vistos ser significativamente maiores nas crianças *H. pylori*-

positivas semelhantemente ao observado para as outras citocinas avaliadas. Nos adultos, os resultados desse estudo diferiram dos resultados de Peek *et al.* (1995)b que não observaram diferença significativa quanto aos níveis gástricos de IL-1 α entre adultos infectados ou não. Vale ressaltar; entretanto, que o número pequeno de pacientes avaliado por Peek *et al.* (1995)b, foi o que comprometeu o resultado, visto que provavelmente ocorreu um erro do tipo II. A IL-1 α é uma citocina citosólica da família da IL-1 com atividade pró-inflamatória potente, assim como a IL-1 β (Dinarello, 1996). Os nossos achados fornecem evidências de que essa citocina tem importância na resposta inflamatória que ocorre na mucosa gástrica durante a infecção pelo *H. pylori*, o que tem sido pouco explorado, especialmente no que se refere aos fatores do hospedeiro que interferem no desfecho da infecção em doença.

É importante salientar que em condições normais, a mucosa gástrica produz naturalmente citocinas, como IL-1 β (Noach *et al.*, 1994; Peek *et al.*, 1995b; Lindholm, *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2004; Vilaichone *et al.*, 2005). Nesse estudo, IL-1 β foi detectada na mucosa gástrica de algumas crianças e adultos não infectados. Foram observados também níveis detectáveis de IL- α na mucosa gástrica de indivíduos *H. pylori*-negativos. Embora não se possa afastar a possibilidade de que outros fatores como o uso de antiinflamatórios não esteróides, como esse foi um critério de exclusão do estudo, é provável que a mucosa gástrica, à semelhança do observado com a IL-1 β , também produza espontaneamente IL-1 α . De fato, tem sido relatado que o precursor da IL-1 α é encontrado em queratinócitos e células epiteliais de indivíduos saudáveis (Werman *et al.*, 2004). Os mecanismos não são conhecidos, mas o fato da IL-1 β ser produzida em condições normais pela mucosa gástrica poderia explicar a expressão de IL-1 α , visto que, dentre as propriedades da IL-1 β , salienta-se a de induzir a produção de outras citocinas inflamatórias.

Nas crianças infectadas, os níveis de IL-1 α correlacionaram-se positivamente com os níveis de IL-8 e TNF- α . Nos adultos *H. pylori*-positivos, também foram vistas correlações

positivas entre os níveis de IL-1 β e IL- α , IL- α e TNF- α e IL-1 β e TNF- α . Como já mencionado, dentre as ações da IL-1 β , ressalta-se a habilidade de induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. Semelhantemente, tem sido atribuída ao TNF- α a função de induzir a produção da IL-1 (Le & Vilcek, 1987). A correlação positiva observada entre os níveis de IL-1 α e IL-8 na mucosa gástrica de crianças infectadas sugere que, a exemplo da IL-1 β e TNF- α , que sabidamente podem induzir a produção de IL-8 “*in vitro*” (Matsushima & Oppenheim, 1989) e na mucosa gástrica infectada pelo *H. pylori* (Noach *et al.*, 1994), a IL-1 α poderia induzir a produção de IL-8. Entretanto, é válido considerar que correlações entre níveis de citocinas podem muitas vezes remeter ao fato de que estariam respondendo a um estímulo comum, e não, necessariamente sinalizando para a produção de outras citocinas.

Quando foram comparados crianças e adultos não infectados pelo *H. pylori*, os níveis gástricos de IL-1 β foram significativamente maiores nos adultos. Nenhuma diferença foi observada nos níveis das outras citocinas entre os grupos. Esse aumento pode significar um evento fisiológico, natural que ocorre na mucosa gástrica dos adultos, sugerindo um papel importante da citocina na proteção da mucosa gástrica contra a acidez, ou, ainda, na proteção da mucosa à colonização pelo *H. pylori*, que, como já demonstrado, ocorre predominantemente na infância.

Quando crianças e adultos *H. pylori*-positivos foram comparados, os níveis de IL-1 α e TNF- α foram vistos ser significativamente maiores na mucosa gástrica de crianças que de adultos; o inverso tendo sido observado quanto à concentração de IL-1 β . Na infância pressupõem-se uma infecção de curta duração, visto que, como já mencionado, a infecção é adquirida predominantemente na idade pré-escolar (Lee, 1994; Rocha *et al.*, 2003). Assim, os títulos elevados de IL-1 α e TNF- α observados nesse estudo são similares aos vistos nas infecções por bactérias Gram-negativas. Por outro lado, vale ressaltar, que tem sido relatado que o grau de inflamação na mucosa gástrica dos indivíduos infectados é menos intenso nas

crianças que nos adultos (Queiroz *et al.*, 1991; Gottrand *et al.*, 1997; Whitney *et al.*, 2000) o que tem sido atribuído ao fato que a infecção é mais regulada nas crianças. Assim, citocinas antiinflamatórias como IL-4 e imunoreguladoras como IL-10 e TGF- β , por exemplo, poderiam estar participando dessa resposta imuno regulatória à infecção pelo *H. pylori*. Entretanto, Lizza *et al.* (2001), embora tenham observado maior expressão de INF- γ , IL-8, IL-18 e IL-17 na mucosa gástrica de crianças *H. pylori*-positivas quando comparadas com crianças *H. pylori*-negativas, não observaram diferenças de expressão de IL-4 e IL-10 entre os grupos. Portanto, esses resultados apontam para a necessidade de estudos avaliando moléculas Th3, como por exemplo, TGF- β .

Nesse estudo, tanto nas crianças como nos adultos, os níveis gástricos de IL-8, mas não de IL- β , IL- α e TNF- α , foram vistos ser significativamente maiores naqueles colonizados por amostras *cagA*-positivas. Esses resultados reproduzem achados em adultos de Peek *et al.* (1995)b e Yamaoka *et al.* (1997), como de Crabtree *et al.* (1994; 1995) e Kim *et al.*, (2006) em estudos “*in vitro*” em células epiteliais gástricas estimuladas por amostras *cagA*-positivas e -negativas. Vale ressaltar que nenhum estudo até o presente momento havia determinado as concentrações de citocinas na mucosa gástrica de crianças infectadas, de acordo com o “status” *cagA* do microrganismo. Como esperado, os níveis de IL-8 foram significativamente maiores na mucosa gástrica de crianças colonizadas por amostras *cagA*-positivas.

Embora haja trabalhos mostrando associação entre o grau da gastrite e o padrão genotípico de *vacA* da amostra (Atherton *et al.*, 1995), não havia estudos avaliando diferenças nas concentrações de citocinas e mosaicismos do *vacA*. Numa primeira análise, os genótipos s1 e m1 associaram-se com concentrações mais elevadas de IL-8. Entretanto, quando os pacientes foram estratificados com base no “status” *cagA*, não se observaram mais as associações, tanto no grupo das crianças quanto no grupo dos adultos. Embora os genes que codificam *cagA* e *vacA* não sejam relacionados (Covacci *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997),

amostras *cagA* geralmente são s1 (van Doorn et al., 1998; Alm & Trus, 1999), o que pode explicar os resultados observados. Da mesma forma que o “status” *cagA*, e portanto, o genótipo s1m1 do *vacA* não se associou com níveis aumentados das demais citocinas pró-inflamatórias avaliadas nesse estudo. Esses resultados “*in vivo*” diferem de um estudo “*in vitro*” (Sun et al., 2006), no qual os níveis de IL-1 β , IL-8 e TNF- α foram vistos ser maiores em culturas de células epiteliais gástricas quando estimuladas com citotoxina vacuolizante. Vale ressaltar; entretanto, que a citotoxina vacuolizante usada no estudo foi apenas purificada parcialmente. Assim, outros componentes microbianos poderiam ter estimulado a liberação dessas citocinas.

Nesse estudo, não foi observada diferença significativa entre crianças ou adultos *H. pylori*-negativos e *H. pylori*-positivos quanto à frequência dos genótipos do gene *IL1B* na posição -31 e -511, *IL1RN* VNTR e *TNFA* na posição -307. Diferenças entre crianças e adultos também não foram observadas, resultados semelhantes aos observados por Queiroz et al. (2005) e Rocha et al. (2005) na nossa população e de El Omar et al. (2000); Machado et al. (2001); Figueiredo et al. (2002), Furuta et al. (2002) e Tseng et al. (2006) em outras populações. Entretanto, Hamajima et al. (2001), ao estudarem adultos japoneses, observaram que o alelo T do *IL1B* foi associado com risco de infecção pelo *H. pylori* e Zambon et al. (2005) demonstraram que a infecção pela bactéria foi vista estar associada ao genótipo heterozigoto (G/A) do gene *TNFA*.

No estudo realizado no Brasil (Rocha et al., 2005), diferentemente do observado em populações caucasianas (El Omar et al., 2000; Machado et al., 2001; Figueiredo et al., 2002), não foram vistas associações entre polimorfismos no gene *IL1B* e risco aumentado de carcinoma gástrico. Por outro lado, polimorfismos no gene *IL1RN* se associaram com carcinoma gástrico na nossa população (Rocha et al., 2005).

Um dos resultados mais importantes do presente estudo foi o achado de que, na nossa população, polimorfismos de *IL1RN*, mas não de *IL1B*, estão associados com aumento nas concentrações de IL-1 β na mucosa gástrica de adultos infectados pelo *H. pylori*. Esses resultados reforçam os achados de Rocha *et al.* (2005). Além disso, o polimorfismo na posição -307 do *TNFA*, em consonância com os achados de Rocha *et al.* (2005) não foi visto estar associado a níveis aumentados de TNF- α .

À semelhança do observado com a IL-1 β , a concentração de IL-1 α nos tecidos poderia ser influenciada pelo antagonista do receptor da IL-1. Assim, poder-se-ia supor que polimorfismos no gene que codifica o antagonista do receptor da IL-1 estariam associados a aumento das concentrações de IL-1 α na mucosa gástrica. Entretanto, nesse estudo não foi observada associação entre polimorfismo no gene *IL1RN* e níveis mais elevados de IL-1 α na mucosa gástrica de crianças e adultos *H. pylori*-positivos. Assim, polimorfismos do *IL1RN*, por mecanismos não compreendidos, interferem na expressão de IL-1 β , mas não de IL-1 α .

6. RESUMO E CONCLUSÕES

1)- A infecção pelo *H. pylori* está associada a um aumento significativo dos níveis gástricos das citocinas IL-1 β , IL-1 α , IL-8 e TNF- α , tanto nas crianças quanto nos adultos na nossa população, resultados semelhantes aos da literatura internacional.

2)- Nos indivíduos não infectados pelo *H. pylori*, os níveis de IL-1 β na mucosa gástrica foram vistos ser significativamente maiores nos adultos que nas crianças; no grupo de indivíduos *H. pylori*-positivos, os níveis gástricos de IL-1 α e TNF- α foram maiores nas crianças que nos adultos, mas os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores nos adultos que nas crianças, indicando nitidamente diferenças da resposta imunológica à infecção pelo *H. pylori*, dependente da idade dos indivíduos.

3)- A infecção por amostras de *H. pylori cagA*-positivas está associada a níveis gástricos mais elevados de IL-8 nos adultos, à semelhança do descrito na literatura. De forma inédita, esse estudo demonstrou, também, essa associação em crianças.

4)- Embora níveis gástricos elevados de IL-8 tenham inicialmente se associado com infecção por amostras de *H. pylori vacA s1m1*, quando os dados foram corrigidos pelo “status” *cagA*, a associação desapareceu.

5)- No grupo *H. pylori*-negativo, tanto nas crianças quanto nos adultos, os polimorfismos nos genes *IL1B*, *IL1RN* e *TNFA* não se associaram a variações nas concentrações gástricas das citocinas.

6)- O alelo polimórfico do gene que codifica o antagonista do receptor da IL-1 associou-se a níveis aumentados de IL-1 β , mas não de IL-1 α , na mucosa gástrica de adultos *H. pylori*-positivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LITCHTMAN, A.H.; *Imunologia Celular e molecular*. 5^a ed., Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, RJ, 580p. , 2005.
- ALM, R.A.; TRUST, T.J. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. **J Mol Med**, v.77, p.834-846, 1999.
- ATHERTON, J.C.; CAO, P.; PEEK Jr, R.M.; TUMMURU, M.K.R.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem**, v.270, p. 17771-17777, 1995.
- BACKERT, S.; ZISKA, E.; BRINKMANN V.; ZIMNY-ARNDT U.; FAUCONNIER, A.; JUNGBLUT, PR.; NAUMANN, M.; MEYER, T.F. Translocation of *Helicobacter pylori* *cagA* into gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. **Cell Microbiol**, v.2, p.155-164, 2000.
- BASSO, D.; PLEBANI, M. *H. pylori* infection: bacterial virulence factors and cytokine gene polymorphisms as determinants of infection outcome. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.43 (suppl 3), p.313-337, 2004.
- BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **J Infect Dis**, v.161, p.626-633, 1990.
- BLASER, M.J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a “slow” bacterial infection. **Trends Microbiol**, v.1, p.255-260, 1993.
- BLASER, M.J.; PARSONNET, J. Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. **J Clin Invest**, v.94, p.4-8, 1994.
- BLASER, M.J. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? **Ann Med**, v.27, p.559-563, 1995.
- BODE, G.; MALFERTHEINER, P.; LEHNHARDT, G.; DITSCHUNEIT, H. Ultrastructural localization of urease in outer membrane and periplasm of *Campylobacter pylori*. **J Clin Pathol**, v.42, p.778-779, 1989.
- BONCRISTIANO, M.; PACANNI, S.R.; BARONE, S.; ULIVIERI, L.; PATRUSSI, L.; ILVER, D.; AMADEI, A.; D’ELIOS, M.M.; TELFORD, J.L.; BALDARI, C.T.; The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T-cell activation by two independent mechanisms. **J Exp Med**, v. 198, p.1887-1897, 2003.
- BRADFORD M.M. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the proteine-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.
- CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J.E.; GHIARA, P.; BORODOVSKY, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*,

encodes types I- specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, p.14648-14653, 1996.

CLAYTON, C.L.; KLEANTHOUS, H.; COATES, P.J.; MORGAN, D.D.; TABAQCHALI, S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. **J. Clin Microbiol**, v.30, p.192-200, 1992.

CON, S.A.; VALERÍN, A.L.; TAKEUCHI, H.; CON-WONG, R.; CON-CHIN, V.G.; CON-CHIN, G.R.; YAGI-CHAVES, S.N.; MENA, F.; PINO, F.B.; ECHANDI, G.; KOBAYASHI, M.; MONGE-IZAGUIRRE, M.; NISHIOKA, M.; MORIMOTO, N.; SUGIURA, T.; ARAKI, K. *Helicobacter pylori* *cagA* status associated with gastric cancer incidence rate variability in Costa Rican regions. **J Gastroenterol**, v.41, p.632-637, 2006.

CORREA, P. Is gastric carcinoma an infectious disease? **N Engl J Med**, v.325, p.1127-1131, 1991.

CORREA, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Am J Surg Pathol**, v.19, suppl.1, s.37-s43, 1995.

COVACCI, A.; CENSINI, S.; BUGNOLI, M.; PETRACCA, R.; BURRONI, D.; MACCHIA, G.; MASSONE, A.; PAPINI, E.; XIANG, Z.; FIGURA, N.; RAPPUOLI, R.; Molecular characterization of the 128 k-Da immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated to cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.90, p.5791-5795, 1993.

COVACCI, A.; FALKOW, S.; BERG, D.E.; RAPPUOLI, R. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? **Trends Microbiol**, v.5, p.205-208, 1997.

COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; DEL GIUDICE, G.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* *cagA* virulence and genetic geography. **Science**, v.284, p.1328-1333, 1999.

COVER, T.L.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori*: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. **ASM News**, v.109, p136-141, 1995.

CRABTREE, J.E.; TAYLOR, J.D.; WYATT, J.I.; HEATLEY, R.V.; SHALLCROSS, T.M.; TOMPKINS, D.S. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. **Lancet**, v.338, p.332-335, 1991.

CRABTREE, J.E.; FARMERY, S.M.; LINDLEY, I.J.; FIGURA, N.; PEICHL, P.; TOMPKINS, D.S. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. **J Clin Pathol**, v.44, p.768-771, 1994.

CRABTREE, J.E.; COVACCI, A.; FARMERY, S.M.; XIANG, Z.; TOMPKINS, D.S.; PERRY, S.; LINDLEY, I.J.D.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with *cagA* positive phenotype. **J Clin Pathol**, v.48, p.41-45, 1995.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, v.87, n.6, p.2095-2147, 1996.

EL-OMAR, E.M.; CARRINGTON, M.; CHOW, W.-H.; McCOLL, K.E.L.; BREM, J.H.; YOUNG, H. A.; HERRERA, J.; LISSOWSKA, J.; YUAN, C.C.; ROTHMAN, N.; LANYONS, G.; MARTIN, M.; FRAUMENI, J.F.; RABKIN, C.S. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, v.404, p.398-402, 2000.

EL-OMAR, E.M.; RABKIN, C.S.; GAMMON, M.D.; VAUGHAN, T.L.; RISCH, H. A.; SCHOENBERG, J.B.; MAYNE, S.T.; GOEDERT, J.; BLOT, W.J.; FRAUMENI, J.F.; CHOW, W.-H.; Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, v.124, p.1193-1201, 2003.

ERZIN, Y.; KOKSAL, V.; ALTUN, S.; DOBRUCALI, A.; ASLAN, M.; ERDAMAR, S.; DIRICAN, A.; KOCAZEYBEK, B. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*, v.11; p.574-580, 2006.

EVANS, D.G.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; EVANS JR., D.J. *Helicobacter pylori cagA* status and s and m alleles of *vacA* in isolates from individuals with a variety of *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *J Clin Microbiol*, v.36, p.3435-3437, 1998.

FALL, C.H.D.; GOGGIN, P.M.; HAWTIN, P.; FINE, D.; DUGGLEBY, S. Growth in infancy, infant feeding, childhood living conditions, and *Helicobacter pylori* infection at age. *Arch Dis Child*, v.77, n.4, p.310314, 1997.

FAN, X.G.; FAN, X.J.; KEELING, P.W.N. Increased gastric production of interleukin-8 and tumor necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol*, v.48, p.133-136, 1995.

FIGUEIREDO, C.; MACHADO, J.C.; PHAROAH, P.; SERUCA, R.; SOUSA, S.; CARVALHO, R.; CAPELINHA, A.F.; QUINT, W.; CALDAS, C.; VAN DOORN, L.J.; CARNEIRO, F.; SOBRINHO-SIMÕES, M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: na opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Nat Cancer Inst*, v.94, n.22, p.1680-1687, 2002.

FORMAN, D.; NEWELL, D.J.; FULLERTON, F.; YARNELL, J.W.G.; STACEY, A.R.; WALD, N.; SITAS, F. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br Med J*, v.302, p.1302-1305, 1991.

FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; SHEN, Z.; FENG, Y.; TAYLOR, N.S.; PASTER, B.J.; ERICSON, R.L.; LAU, C.N.; CORREA, P.; ARAYA, J.C.; ROA, T. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology*, v.114, p.755-763, 1998.

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

- GATTI, L.L.; MÓDENA, J.L.P.; PAYÃO, S.L.M.; SMITH, M.A.C.; FUKUHARA, Y.; MÓDENA, J.L.P.; OLIVEIRA, R.B.; BROCCHI, M. Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Tropica**, v.100, p.232-240, 2006.
- GEBERT, B.; FISHER, W.; WEISS, E.; HOFFMANN, R.; HAAS, R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. **Science**, v.301, p.1099-1102, 2003.
- GERHARD, M., RAD, R.; PRINZ, C.; NAUMANN, M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v.7 (suppl 1), p.17-23, 2002.
- GOODMAN, K.J.; CORREA, P.; AUX, H.J.T.; RAMÍREZ, H.; DeLANY, J.P.; PEPINOSA, O.G.; QUIÑONES, M.L.; PARRA, T.C. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. **Am J Epidemiol**, v. 144, p.290-299, 1996.
- GOTTRAND, F.; CULLU, F.; TURCK, D.; VINCENT, P.; MICHAUD, L.; HUSSON, M.O.; MARTIN-DELASALLE, E.; FARRIAUX, J.P. Normal gastric histology in *Helicobacter pylori*-infected children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.23, n.3, p.74-78, 1997.
- GUIRALDES, E.; DUARTE, I.; PEÑA, A.; GODOY, A.; ESPINOSA, M.N.; BRAVO, R.; LARRAÍN, F.; SCHULTZ, M.; HARRIS, P. Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.33, p.127-132, 2001.
- GUSMÃO, V.R.; MENDES, E.N.; QUEIROZ, D.M.M; ROCHA, G.A.; ROCHA, A.M.C.; ASHOUR, A.A.R.; CARVALHO, A.S.T. *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. **J Clin Microbiol**, v.38, n.8, p.2853-2857, 2000.
- HAMAJIMA, N.; MATSUO, K.; SAITO, T.; TAJIMA, K.; OKUMA, K.; YAMAO, K.; TOMINAGA, S. Interleukin 1 polymorphisms, lifestyle factors, and *Helicobacter pylori* infection. **Jpn J Cancer Res**, v.92, p.383-389, 2001.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. **Inter J Antimicrobiol Agents**, v.22, p.360-366, 2003.
- HAZELL, S.L.; LEE, A.; BRADY, L.; HENESSY, W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of epithelium. **J Infect Dis**, v.153, p.658-663, 1986.
- HELD, M.; ERGSTRAND, L.; HANSSON, L.E.; BERGSTRÖM, R.; WADSRTRÖM, T.; NYRÉN, O. Is the association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer confined to *cagA*-positive strains? **Helicobacter**, v.9, n.3, 2004.
- HUSSON, M.D.; GOTTRAND, F.; VACHEE, A.; DHAENENS, L.; SALLE, E.M.; TURCK, D., HOUCHE, M.; LeCLERE, H. Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. **J Clin Microbiol**, v.33, p.3300-3303, 1995.

HWANG, I.R.; KODAMA, T.; KIKUCHI, S.; SAKAI, K.; PETERSON, L.E.; GRAHAM, D.Y.; YAMAOKA, Y. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 β production in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v.123, n.6, p.1793-1803, 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. **Lyon, IARC/WHO**, v.61, p.177-241, 1994.

KAMALI-SARVESTANI, E.; BAZARGANI, A.; MASOUDIAN, M.; LANKARANI, K.; TAGHAVI, A.R.; SABERIFIROOZI, M. Association of *H. pylori cagA* and *vacA* genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. **World J Gastroenterol**, v.12, n.32, p.5205-5210, 2006.

KATAGIRI, M.; ASAKA, M.; KOBAYASHI, M.; KUDO, M.; KATO, M.; TAKEDA, H. Increased cytokine production by gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. **J Clin Gastroenterol**, v.25 (suppl.1), p.211-214, 1997.

KATO, S.; ONDA, M.; YAMADA, S.; MATSUDA, N.; TOKUNAGA, A.; MATSUKURA, N. Association of the interleukin-1 β genetic polymorphism and gastric cancer risk in Japanese. **J Gastroenterol**, v.36, p.696-699, 2001.

KELLY, S.M.; PITCHER, M.C.; FARMERY, S.M.; GIBSON, G.R. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. **Gastroenterology**, v.107, p.1671-1674, 1994.

KIDD, M.; LASTOVICA, A.J.; ATHERTON, J.C.; LOUW, J.A. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in south Africa? **Gut**, v.45, p.499-502, 1999.

KIM, S.Y.; LEE, Y.C.; KIM, H.K.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori cagA* transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. **Cell Microbiol**, v.8, p.97-106, 2006.

KINDERMANN, A.; KONSTANTOPOULOS, N.; DEMMELMAIR, H.; KOLETZKO, S. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays, testing immunoglobulin G (IgG) and IgA responses, for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. **J Clin Microbiol**, v.39, p.591-596, 2001.

KUCK, D.; KOLMERER, B.; IKING-KONERT, C.; KRAMMER, P.H.; STREMMEL, W.; RUDI, J. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. **Infect Immun**, v.69, n.8, p.5080-5087, 2001.

KUPIERS, E.J.; PÉREZ-PÉREZ, G.I.; MEUWISSEN, S.G.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. **J Natl Cancer Inst**, v.87, p.1777-1780, 1995.

KUTUKCULER, N.; AYDOGDU, S.; GOKSEN, D.; CAGLAYAN, S.; YAGCYI, R.V.; Increased mucosal inflammatory cytokines in children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. **Acta Paediatr**, v. 86, n. 9, p.928-931, 1997.

LE, J.; VILCEK, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **Lab Invest**, v.53, n.3, p.234-248, 1987.

LEE, A. The microbiology and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol**, v.29 (suppl 201), p.2-6, 1994.

LEE, S.G.; KIM, B.; CHOI, W.; LEE, I.; CHOI, J. SONG, K. Lack of association between pro-inflammatory genotypes of the interleukin-1 (IL-1B C/+ and IL-1RN *2/*2) and gastric cancer/duodenal ulcer in Korean population. **Cytokine**, v.21, p. 167-171, 2003.

LINDHOLM, C.; QUIDING-JARBRINK, M.; LONROTH, H.; HAMLET, A.; SVENNERHOLM, A.M. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. **Infect Immun**, v.66, n.12, p.5564-5571, 1998.

LUZZA, F.; PARRELLO, T.; SEBKOVA, L.; PENSABENE, L.; IMENEO, M.; MANCUSO, M.; LA VECCHIA, A.M.; MONTELEONE, G.; STRISCIUGLIO, T.; PELLONE, F. Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children. **Digest Liver Dis**, v.33, p.14-20, 2001.

MACHADO, J.C.; PHAROAH, P.; SOUSA, S.; CARVALHO, R.; OLIVEIRA, C.; FIGUEIREDO, C.; AMORIM, A.; SERUCA, R.; CALDAS, C.; CARNEIRO, F.; SOBRINHO-SIMÕES, M. Interleukin 1B and Interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. **Gastroenterology**, v.121, p.823-829, 2001.

MACHADO, J.C.; FIGUEIREDO, C.; CANEDO, P.; PHAROAH, P.; CARVALHO, R.; NABAIS, S.; ALVES, C.C.; CAMPOS, M.L.; VAN DOORN, I.-J.; CALDAS, C.; SERUCA, R.; CARNEIRO, F.; SOBRINHO-SIMÕES, M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. **Gastroenterology**, v.125, p.364-371, 2003.

MALATY, H.M.; GRAHAM, D.Y. Importance of childhood socioeconomic status in the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **GUT**, v.35, p.742-745, 1994.

MANSIFIELD, J.C.; HOLDEN, H.; TARLOW, J.K.; DI GIOVINE, F.S.; McDOWELL, T.L.; WILSON, A.G.; HOLDSWORTH, C.D.; DUFF, G.W. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. **Gastroenterology**, v.106, p.637-642, 1994.

MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori*. **Am J Gastroenterol**, v.89, p.116-128, 1994.

MATSUSHIMA, K.; OPPENHEIM, J.J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. **Cytokine**, v.1, p.2-13, 1989.

MCFADDIN. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Buenos Aires. **Panamericana** 1980.

MÉGRAUD, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterol Clin N Am**, v.22, p.73-88, 1993.

MIEHLKE, S.; KIRSCH, C.; AGHA-AMIRI, K.; GUNTHER, T.; LEHN, N.; MALFERTHEINER, P.; STOLTE, M.; EHNINGER, G.; BAYENDORFFER, E. The *Helicobacter pylori* vacA s1m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. **Int J Cancer**, v.87, p.659-653, 2000.

MONTECUCCO, C.; DE BERNARD, M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. **Microbes Infect**, v.5, p.715-21, 2003.

NAKAYAMA, M.; KIMURA, M.; WADA, A.; YAHIRO, K.; OGUSHI, K.-I.; NIIDOME, T.; FUJIKAWA, A.; SHIRASAKA, D.; AOYAMA, N.; KURAZONO, H.; NODA, M.; MOSS, J.; HIRAYAMA, T. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. **J Biol Chem**, v.279, n.8, p.7024-7028, 2004.

NOACH, L.A.; BOSMA N.B.; JANSEN J.; HOEK F.J. VAN DEVENTER, D.J.; TYTGAT, G.N. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. **Scand J Gastroenterol**, v.29, p.425-429, 1994.

NOGUEIRA, C.; FIGUEIREDO, C.; CARNEIRO, F.; GOMES, A.T.; BARREIRA, R.; FIGUEIRA, P.; SALGADO, C.; BELO, L.; PEIXOTO, A., BRAVO, J.C.; BRAVO, L.E.; REALPE, J.L., PLASIER, A.P.; QUINT, W.G.; RUIZ, B.; CORREA, P.; VAN DOORN, L-J. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. **Am J Pathol**, v.158, p.647-654, 2001.

NOMURA, A.M.; PEREZ-PEREZ, G.I.; LEE, J.; STEMMERMANN, G.; BLASER, M.J. Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. **Am J Epidemiol**, v.155, p.1054-1059, 2002.

ODENBREIT, S.; PULS, J.; SEDLMAIER, B.; GERLAND, E.; FISCHER, W.; HAAS, R. Translocation of *Helicobacter pylori* cagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Science**, v.287, p.1497-1500, 2000.

OLIVEIRA, A.M.R.; ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; CARVALHO, A.S.T.; FERRARI, T.C.A.; NOGUEIRA, A.M.M.F. Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. **J. Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.28, p.157-161, 1999.

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G.D.; VANDERSTEEN, D.P.; CHANG, Y.; VOGELMAN, J.H.; ORENTREICH, N.; SIBLEY, R.K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. **N Engl J Med**, v.325, p.1127-1131, 1991.

PARSONNET, J.; HANSEN, S.; RODRÍGUES, L.; GELB, A.B.; WARNKE, R.A.; JELLUM, E.; ORENTREICH, N.; VOGELMAN, J.H.; FRIEDMAN, G.D. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **N Engl J Med**, v.330, p.1267-1271, 1994.

PEEK Jr, R.M.; MILLER, G.G.; THAM, K.T.; PÉREZ-PÉREZ, G.I.; COVER, T.L.; ATHERTON, J.C.; DUNN, G.L., BLASER, M.J. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. **J Clin Microbiol**, v.33, p.28-32, 1995a.

PEEK Jr, R.M.; MILLER, G.G.; THAM, K.T.; PÉREZ-PÉREZ, G.I.; ZHAO, X.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. **Lab Investigation**, v.71, p.760-770, 1995b.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A. Indicator medium for the isolation of *Campylobacter pylori*. **J Clin Microbiol**, v.25, p.2378-2379, 1987.

QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N.; CARVALHO, A.S.T; BARBOSA, A.J.A.; OLIVEIRA, C.A.; LIMA, Jr, G.F. Differences in distribution and severity of *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults with duodenal ulcer diseases. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.12, p.178-181, 1991.

QUEIROZ, D.M.M.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N. *Helicobacter pylori*. **Enf Inf Microbiol**, v.15, p.424-429, 1995.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, C.A.; MAGALHÃES, P.P.; MOURA, S.B.; CABRAL, M.M.D.A.; NOGUEIRA, A.M.M.F. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int J Cancer**, v.78, p.35-39, 1998.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; CARVALHO, A.S.T.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R., SOARES, T.F.; SANTOS, A.; CABRAL, M.M.D.A.; NOGUEIRA, A.M.M.F. Factors associated with *Helicobacter infection* by a *cagA*-positive strain in children. **J Infect Dis**, v.181, p.626-630, 2000.

QUEIROZ, D.M.M.; BITTENCOURT, P.; GUERRA, J.B.; ROCHA, A.M.C.; ROCHA, G.A.; CARVALHO, A.S.T. *IL1RN* polymorphism and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains increase the risk of duodenal ulcer in children. **Pediatric Research**, v.58, n.5, p.892-896, 2005.

RAD, R.; DOSSUMBEKOVA, A.; NEU B.; LANG, R.; BAUER, S.; SAUR.; GERHARD, M.; PRINZ, C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v.53, p.1082-1089, 2004.

RAUTELIN, H.; BLOMBERG, B.; JARNEROT, G., DANIELSSON, D. Nonopsonic activation of neutrophils and cytotoxin production by *Helicobacter pylori*: ulcerogenic markers. **Scand J Gastroenterol**, v.29, p.128-132, 1994.

REDLINGER, T.; O'ROURKE, K.; GOODMAN, K.J. Age distribution of *Helicobacter pylori* seroprevalence among young children in a United States/Mexico border community: evidence for transitory infection. **Am J Epidemiol**, v.150, n.3, p.225-230, 1999.

RESENDE, L.M.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; ROCHA, G.A.; COELHO, L.G.; PASSOS, M.C.; CASTRO, L.P.; OLIVEIRA, C.A.; LIMA JUNIOR, G.F. Comparison of the urease test and of direct smear examination in the control of treatment of *Helicobacter pylori*-induced infection. **Braz J Med Biol Res**, v.26, p.699-702, 1993.

ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.N.; LAGE, A.P.; BARBOSA, A.J.A. Simple carbolfuchsin staining for showing *Campylobacter pylori* and other spiral bacteria in gastric mucosa. **J Clin Pathol**, v.42, p.1004-1005, 1989.

ROCHA, A.M.C.; ROCHA, G.A.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, C.A.; QUEIROZ, D.M.M.Q. Accuracy of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for *cagA* in patients from Brazil with and without gastric carcinoma. **J Clin Microbiol**, v.41, p.447-448, 2003.

ROCHA, G.A.; GUERRA, J.B.; ROCHA, A.M.C.; SARAIVA, I.E.B.; SILVA, D.A.; OLIVEIRA, C.A.; QUEIROZ, D.M.M. *IL1RN* polymorphic gene and *cagA* status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. **Int J Cancer**, v.115, p.678-683, 2005.

SANTTILA, S.; SAVINAINEN K.; HURME, M. Presence of the IL-1RA allele 2 (*IL1RN*2*) is associated with enhanced IL-1 β *In vitro*. **Scand J Immunol**, v. 47, p.195-198, 1998.

SARKER, A.S.; MAHALANABIS, D.; HILDEBRAND, P.; RAHAMAN, M.M.; BARDHAN, P.K.; FUCHS, G.; BEGLINGER, C.; GYR, K. *Helicobacter pylori*: prevalence, transmission and serum pepsinogen II concentrations in children of poor periurban community in Bangladesh. **Clin Infect Dis**, v.25, p.990-995, 1997.

SHIMIZU, T.; HARUNA, H.; OHTSUKA, Y.; KANEDO, K.; GUPTA, R.; YAMASHIRO, Y. Cytokines in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* infection. **Acta Paediatr**, v.93, p.322-326, 2004.

SICINSCHI, L.A.; LOPEZ-CARRILO, L.; CAMARGO, M.C.; CORREA, P.; SIERRA, R.A.; HENRY, R.R.; CHEN, J.; ZABALETA, J.; PIAZUELO, M.B.; SCHNEIDER, B.G. Gastric cancer risk in a Mexican population: role of *Helicobacter pylori cagA* positive infection and polymorphisms in interleukin-1 and-10 genes. **Int J Cancer**, v.118, n.3, p.649-657, 2006.

SOARES, T. F.; ROCHA, G. A.; ROCHA, A.M.C., CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MATINS-FILHO, O.A.; CARVALHO, A.S.T.; BITTENCOURT, P.; OLIVEIRA, C.A.; FARIA, A.M.C.; QUEIROZ, D.M.M. Phenotypic study of peripheral blood lymphocytes and humoral immune response in *Helicobacter pylori* infection according age. **Scand J Immunol** v.62, p.63-70, 2005.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med**, v.347, n.15, p.1175-1186, 2002.

SUN, J.; AOKI, K.; ZHENG, X.H., SU, B.Z. OUGYANG, X.H.; M. Effect of NaCl and *Helicobacter pylori* cytotoxin on cytokine expression and viability. **World J Gastroenterol**, v.12, n.14, p.2174-2180, 2006.

THOMPSON M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. *Genética Médica*, 5^a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, RJ, 339p. 1993.

TOMB, J.F.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A.R.; CLAYTON, R.A.; SUTTON, G.G.; FLEISCHMANN, R.D.; KETCHUM, K.A.; KLENK, H.P.; GILL, S.; DOUGHERTY, B.A.; NELSON, K.; QUACKENBUSH, J.; ZHOU, L.; KIRKNESS E.F.; PETERSON, S.; LOFTUS, B.; RICHARDSON, D.; DODSON, R.; KHALAK, H.G.; GLODEK, A.; McKNNEY, K.; FITZGERALD, L.M.; LEE, N.; ADAMS, M.D.; HICKEY, E.K.; BERG, D.E.; GOCAYNE, J.D.; UTTERBACK, T.R.; PETERSON, J.D.; KELLEY, J.M.; COTTON, M.D.; WEIDMAN, J.M.; FUJII, C.; BOWMAN C.; WATTHEY, L.; WALLIN, E.; HAYES, W.S.; BORODOVSKY, M.; KARP, P.D.; SMITH, H.O.; FRASER, C.M.; VENTER, J.C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**, v.388, p.539-547, 1997.

TORRES, J.; PÉREZ-PERÉZ, G.; GOODMAN, K.J.; ATHERTON, J.C.; GOLD, B.D.; HARRIS, P.R.; GARZA, A.M.; GUARNER, J.; MUÑOS, O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Arch Med Res**, v.31, p.431-469, 2000.

TSENG, F.C.; BROWN, E.E.; MAIESE, E.M.; YEAGER, M.; WELCH, R.; GOLD, B.D.; OWENS, M.; CRANSTON, B.; HANCHARD, B.; EL-OMAR, E.M.; HISADA, M. polymorphisms in cytokine genes and risk of *Helicobacter pylori* infection among Jamaican children. **Helicobacter**, v.11, p.425-430, 2006.

TSUJI, S. ; TSUJII, M. ; SUN, W.H. ; GUNAWAN, E.S. ; MURATA, H. ; KAWANO, S. ; HORI, M. *Helicobacter pylori* and carcinogenesis. **J Clin Gastroenterol**, v.25 (Suppl.1), p.186-197, 1997.

VAN DOORN L.-J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PENA, S.; MIDOLO, P.; ENDERS, K.W.N.G.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; QUINT, W.G.U. Expanding allelic diversity of *Helicobacter vacA*. **J Clin Microbiol**, v.36; p.2597-2603, 1998.

VAN DOORN, L.-J.; FIGUEIREDO, C.; MÉGRAUD, F.; PENA, S.; MIDOLO, P.; QUEIROZ, D.M.M.; CARNEIRO, F.; VANDERBOGHT, B.; PEGADO, M.G.F.; SANNA, R.; DE BOER, W.; SCHNEEBERGER, P.M.; CORREA, P.; NG, E.K.W.; ATHERTON, J.; BLASER, M.J.; QUINT, W.G.V. Geografic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.116, p.823-830,1999.

VILAICHONE, R.-K.; MAHACHAI, V.; TUMWARSORN, S.; WU, J.Y.; GRAHAM, D.Y.; YAMAOKA, Y. Gastric mucosal cytokine levels in relation to host interleukin-1 polymorphisms and *Helicobacter pylori cagA* genotype. **Scand J Gastroenterol**, v.40, p.530-539, 2005.

WERMAN, A.; WERMAN-VENKERT, R.; WHITE, R.; LEE, J.K.; WERMAN, B.; KRELIN, Y.; VORONOV, E.; DINARELLO, C.A.; APTE, R.N. The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. **PNAS**, v.101, n.8, p.2434-2439, 2004.

WHITNEY, A.E.; GUARNER, J.; HUTWAGNER, L.; GOLD, B.D. *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults: comparative histopathologic study. **Ann Diagn Pathol**, v.4, n.5, p.279-285, 2000.

WOTHERSPOON, A.C.; PATH, M.R.C. Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. **Annu Rev Med**, v.49, p.289-299, 1998.

XUAN, J.; DEGUCHI, R.; WATANABE, S.; OZAWA, H.; URANO, T.; OGAWA, Y.; FUKUDA, R., KIJIMA, H.; KOGA, Y.; TAKAGI, A. Relationship between IL-1 β gene polymorphism and gastric mucosal IL-1 β levels in patients with *Helicobacter pylori* infection. **J Gastroenterol**, v. 40, p. 796-801, 2005.

YAMAOKA, Y.; KITA, M.; KODAMA, T.; SAWAI, N.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains. **Gut**, v.41, p. 442-451, 1997.

ZAMBON, A.-F.; BASSO, D.; NAVAGLIA, F.; BELLUCO, C.; FALDA, A.; FOGAR, P.; GRECO, E.; GALLO, N.; RUGGE, M.; DI MARIO, F.; PLEBANI, M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. **Cytokine**, v.29, p.141-152, 2005.

8. REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

(www.infobiogen.fr/)

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).