



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

**IMPACTO DE POLIMORFISMOS NO GENE *IL10* SOBRE A
PRODUÇÃO ESPONTANEA DE IL-10 E SOBRE A
INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori***

MESTRANDO

SHIRLEIDE DE ASSIS LIMA

SALVADOR - BAHIA

2013

SHIRLEIDE DE ASSIS LIMA

**IMPACTO DE POLIMORFISMOS NO GENE *IL10* SOBRE A
PRODUÇÃO ESPONTANEA DE IL-10 E SOBRE A
INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Alexandrina V. Figueiredo

Salvador, BA
2013

Autorizo a reprodução e divulgação parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

L732 Lima, Shirleide de Assis
Impacto de polimorfismos no gene *IL10* sobre a produção espontânea de IL-10 e sobre a infecção por *helicobacter pylori* / Shirleide de Assis Lima. – Salvador, 2013.
64 f.
Orientadora: Prof^a Dr^a Camila Alexandrina Viana Figueiredo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós Graduação em Imunologia, 2013.
1. Gene *IL10*. 2. Produção Espontânea. 3. *Helicobacter pylori*. I. Figueiredo, Camila Alexandrina Viana. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.
CDU 616.33

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que me apoiaram nesta jornada, e, ao meu avô Valter Assis, que teve complicações com esse ser unicelular e assim me incentivou a estudar mais para melhor conhecer esse tema.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me oportunizado a conhecer a vida, a ciência e ter me fortalecido nos momentos mais difíceis, permitindo assim alcançar meus objetivos;

Aos **Meus familiares** por acreditar, apoiar e contribuir para a concretização deste trabalho ;

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia** pela oportunidade de ingressar e me aperfeiçoar academicamente;

A minha orientadora **Profª. Drª. Camila Alexandrina** que acreditou em sua discente, a oportunizou como bolsista permanecer e apoiou a futura mestrandia a ir em busca da realização dos seus objetivos;

A **Profª. Darizy Vasconcelos** pela força, companheirismo e total paciência nos experimentos, além de, estar sempre disposta a contribuir;

A **Cintia Marques** que contribuiu muito para a realização deste trabalho, mostrando-se sempre a disposição nos esclarecimentos de dúvidas e assim, fez nascer uma bela amizade;

As minhas queridíssimas **Keina Maciely, Tatiane Oliveira e Ana Tereza** que me incentivaram nesta decisão de fazer o mestrado e dele fez brotar uma amizade linda e verdadeira;

Aos colegas de laboratório do **LAA (Profª Neuza, Leonardo, João, Felipe, Ana Amor, Kellyanne, Gabriela, Márcia)** e **LABIMFAR (Ryan, Tamires, Marta, Norma)** do **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (Quiara, Letícia, Evandro, William)**, enfim, a todos que pertencem a esta família, pelos risos, parceria e divisão de experiências;

Aos **meus colegas de ingresso no curso de mestrado do PPGIM**, pelas diversões, apoio e gargalhadas ao longo das aulas e intensos seminários;

Ao **CNPQ, FAPESB**, pelo apoio financeiro;

“ O espaço infinito entre uma ideia e sua realização ideal somente pode ser ocupado pelo insaciável desejo humano de transgredir.”

Maxwell Nascimento.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno
CagA	Citotoxina associada ao antígeno A
CD	Células dendríticas
CI	Confidence interval (Intervalo de confiança)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Tecido linfoide associado a mucosa
MHC	Complexo de imunohistocompatibilidade
OR	Odds ratio (razão de chances)
p	Probabilidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMN	Polimorfonucleares
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Simples)
TNF- α	Fator de necrose tumoral
VacA	Fator vacuolinizante associada a citotoxina A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	<i>Helicobacter pylori</i>	13
2.2	Resposta Imunológica	17
2.3	IL-10 e Susceptibilidade genética	22
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	25
4	ARTIGO CIENTÍFICO:	
	Genetic Variations on <i>IL10</i> Gene, IL-10 production and <i>Helicobacter pylori</i>	
	Infection	26
4.1	Abstract	27
4.2	Introduction	29
4.3	Materials and Methods	31
4.4	Results	35
4.5	Discussion	38
4.6	References	40
5	CONCLUSÃO GERAL	43
	REFERENCIAS	44
	ANEXO	65

RESUMO

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um importante fator de risco para o câncer gástrico, provavelmente pela extensa inflamação causada por esta bactéria na mucosa gástrica. O câncer gástrico é a segunda maior causa de mortalidade no mundo. Muitos estudos tem reportado uma associação entre polimorfismos *IL10* e o risco de câncer gástrico e concentração da citocina IL-10. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre variantes genéticas do *IL10*, infecção por *H. pylori* (presença de IgG anti-*H. pylori*) e produção de IL-10 por leucócitos do sangue periférico. Genotipamos 12 SNPs da *IL10* em 1.353 crianças com idade 4-11 anos residentes numa área urbana em Salvador, Brasil, usando Taqman. Os testes de associação foram realizados utilizando regressão logística para avaliar a associação com a presença de IgG anti- *H. pylori* e regressão linear para produção espontânea de IL-10 (culturas de sangue periférico) incluindo sexo, idade e componentes principais para marcadores de ancestralidade como co-variáveis, usando PLINK. Nossos resultados mostraram que os SNPs rs1800896 ($p=0.02$), rs1878672 ($p=0.05$) e rs3024491 ($p=0.04$) no gene *IL10* foram associados positivamente com exposição para infecção por *H. pylori*. Um total de 8 SNPs foram associados a produção espontânea de IL-10. Alguns desses SNPs que foram positivamente associados com a infecção por *H. pylori* também foram associados a produção espontânea de IL-10 em cultura ($p=0.04$ para rs1800896, $p= 0.04$ para rs1878672 e $p= 0.01$ para rs3024491). Através dos resultados obtidos, sugerimos que as variantes rs1800896, rs3024491 e rs1878672 por induzirem uma maior produção de IL-10 estão mais consistentemente associadas a presença de IgG anti-*H.pylori*. Novos trabalhos devem ser conduzidos no sentido de elucidar o papel das outras variantes bem como verificar o impacto destas na ocorrência de câncer gástrico.

Palavras chaves: gene *IL10*, *H. pylori*, *IL-10*, SNPs.

ABSTRACT

The *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a strong risk factor for gastric cancer, likely due to the extensive inflammation in the stomach mucosa caused by this bacteria. Many studies have reported an association between *IL10* polymorphisms and the risk of gastric cancer and IL-10 production. The aim of the study was to evaluate the association between *IL10* genetic variants, *H. pylori* infection and IL-10 production by peripheral blood leukocytes in children. We genotyped a total of 12 SNPs on *IL10* in 1,353 children aged 4-11 years living in a poor urban area in Salvador, Brazil, using TaqMan probe based, 5' nuclease assay minor groove binder chemistry. Association tests were performed by logistic regression for *H. pylori* infection and linear regression for IL-10 spontaneous production (whole blood cultures) including sex, age and principal components for informative ancestry markers as covariates, using PLINK. Our results shown that SNPs rs1800896 (OR: 1,249; 95% CI: 1,031-1,513), rs3024491 (OR: 1,233; 95% CI: 1,013-1,502), rs1878672 (OR: 1,217; 95% CI: 0,9995 -1,481) on *IL10* were positively associated with exposure to *H. pylori* infection. A total of eight SNPs were associated with IL-10 spontaneous production. Some of these SNPs that were strongly associated with infection by *H. pylori* have also been associated with the spontaneous production of IL-10 in culture (p = 0.04 for rs1800896, rs1878672 for p = 0.04 and p = 0.01 for rs3024491). From our results, we suggest that variants rs1800896, rs3024491 and rs1878672 by inducing increased production of IL-10 are more consistently associated with the presence of IgG anti-*H.pylori*. Further studies should be conducted to further elucidate the role of other variants as well as investigate their impact on the occurrence of gastric cancer.

Keywords: *IL 10* gene, *H. pylori*, *IL-10*, SNPs.

1 INTRODUÇÃO

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria associada ao desenvolvimento do câncer gástrico, decorrente da inflamação persistente (KIM et al, 2012). Especula-se que o mecanismo esteja associado à inflamação crônica, sendo esta última, uma das principais causas de mortalidade no mundo ocidental e está associada a diversas patologias, tal como, o câncer (PORTA et al, 2009).

Mundialmente, o câncer gástrico é a segunda maior causa de morte. Sabe-se que muitos fatores ambientais contribuem para o surgimento deste carcinoma gástrico, dentre eles, dietas com baixo consumo de frutas e vegetais (MEIRA et al, 2011), alto consumo de sal, nitritos, o fumo (HU et al, 2011), e, especialmente, a infecção por *H.pylori*, como citado anteriormente, um importante fator de risco para o desenvolvimento deste câncer devido a extensa inflamação gerada (ZENG et al, 2012).

A infecção por *H. pylori* acomete metade da população mundial. Muitos indivíduos iniciam a colonização na infância, mas, apenas uma pequena parcela desta população desenvolve a doença, o que dependerá das estirpes virulentas, desencadeando assim, gastrites, úlceras pépticas, linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) e/ou câncer gástrico (ERNST,2000).

Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (WGO), a infecção por *H. pylori* está associada com a falta de saneamento adequado, água potável, higiene básica, dietas pobres e superpopulação.

Apesar de acometer metade da população mundial a prevalência desta infecção é maior nos países em desenvolvimento. No Brasil, esta prevalência pode chegar a 82% nos adultos e 78% para jovens (idade de 10-19 anos) (WGO, 2010).

Segundo Datolli *et al* (2010), apesar da epidemiologia desta infecção ainda ser muito pouco estudada no Brasil, na população de Salvador estimou-se uma soroprevalência de 28,7% para a infecção por *H. pylori* em um estudo coorte em crianças.

A infecção por *H. pylori* desencadeia no hospedeiro uma resposta imune tanto inata quanto adquirida. A imunopatologia desta infecção envolve a mediação de citocinas, infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nas células da mucosa gástrica, assim como, indução de resposta humoral específica (BERGMAN *et al*, 2006).

Na resposta adquirida da infecção por *H. pylori* em ambas as fases aguda e crônica ocorre o envolvimento de células T auxiliares específicas contra a bactéria. Na fase aguda, as células T_{H1} que secretam fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ) que objetivam lisar as células através da ativação de linfócitos T CD8+. Sendo assim, atuam na defesa celular contra patógenos intracelulares, mas, uma resposta exaustiva pode resultar em danos teciduais na mucosa gástrica. Na resposta crônica, ocorrem as respostas T_{H1} e T_{H2}. As células T_{H2} secretam interleucina-4 e 5 (IL-4 e IL-5) que estão envolvidas na regulação negativa de células T_{H1} e eventos inflamatórios que também facilitam a produção de anticorpos pelas células B (BERGMAN *et al*, 2006).

Na patogênese da infecção por *H. pylori*, as células apresentadoras de antígeno (APCs) através de sinais co-estimulatórios e da citocinas inibitórias, tais como IL-10, estimulam as células T CD4⁺ *naive* a se diferenciarem em células T_{reg} que estimulam ainda mais a produção da citocina IL-10 atuando assim, na regulação negativa de células T_{H1}, macrófagos e produção de anticorpos pelas células B

(BERGMAN *et al*, 2006). Dessa forma, a IL-10 tem uma habilidade para suprimir a apresentação de antígeno das células apresentadoras de antígeno da *H.pylori* (WU *et al*, 2002).

Muitos indivíduos iniciam a colonização na infância, mas, apenas uma pequena parcela desta população desenvolve a doença. Isso pode decorrer devido à virulência das estirpes. No entanto, diversos estudos tem demonstrado a predisposição genética do indivíduo associada à infecção por *H. pylori* (PERSSON, 2011; ERNST,2000). Dentre os genes mais frequentemente estudados, o *IL10* merece destaque, pois codifica uma importante citocina mediadora para a fisiopatologia do câncer gástrico bem como a predisposição a infecção por *H. pylori* (PERSSON, 2011).

Os polimorfismos no gene da IL-10 podem alterar a produção da interleucina, bem como a sua função e/ou atividade (SUAREZ, 2003). Dessa forma, é possível que polimorfismos no gene da IL-10 tenham um papel na susceptibilidade ao câncer, na modulação e no desenvolvimento do tumor, afirma HOWELL *et al* (2007).

Desta forma o presente trabalho será apresentado a seguir em uma revisão de literatura abordando em tópicos os temas infecção por *Helicobacter pylori*, imunopatogênese desta infecção e polimorfismos da citocina IL-10, e, em seguida, a hipótese, os objetivos e um artigo apresentando os resultados e discussões segundo as recomendações da revista ***Helicobacter***.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - *Helicobacter pylori*

Na década de 80, os cientistas australianos Barry Marshall e Robin Warren acreditavam que as úlceras pépticas eram decorrentes de infecções na mucosa gástricas. Após tentativas de cultivo eles conseguiram isolar a bactéria obtida por cultivo de tecidos de biopsias e classificaram o agente no gênero *Campylobacter* (MARSHALL E WARREN, 1984).

A fim de testar os postulados de Koch, que estabelece uma relação causal entre uma infecção e o aparecimento da doença, voluntariamente, Marshall ingeriu a cultura da bactéria em estudo, e analisou cronologicamente o aparecimento da gastrite, os sintomas e posteriormente o tratamento com antibióticos e sais de bismuto (MARSHALL et al, 1985). Com o auxílio da microbiologia, estudos de composição do RNA ribossômico e de sequenciamento e hibridação do DNA da bactéria, os pesquisadores identificaram a bactéria como *Helicobacter pylori*.

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa, conhecida por persistentemente colonizar a mucosa do estômago. Esta bactéria está altamente associada ao desenvolvimento do câncer gástrico, decorrente da inflamação persistente (KIM et al, 2012). Especula-se que o mecanismo esteja associado à inflamação crônica, sendo esta última, uma das principais causas de mortalidade no mundo ocidental e está associada a diversas patologias, tal como, o câncer gástrico (LIU, 2012; PORTA et al, 2009). Mas, em muitos pacientes, a *H. pylori* não causa sintomas clínicos e a infecção pode persistir por muito tempo assintomática (SERRANO, 2007).

Apesar de alguns pacientes serem assintomáticos, a infecção por *H. pylori* acomete metade da população mundial. Muitos indivíduos iniciam a colonização na infância, mas, apenas uma pequena parcela desta população desenvolve a doença. A persistência da infecção por *H.pylori* lesa o revestimento do estômago causando desconforto, dor e náuseas, desencadeando o fenômeno chamado de gastrite.

A infecção crônica promove úlceras pépticas (áreas erodidas e inflamadas), linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT) e/ou câncer gástrico (ERNST,2000). Entretanto, cerca de 1% dos pacientes infectados desenvolvem adenocarcinoma ou linfoma de estômago de acordo com a resposta do hospedeiro e a virulência da estirpe (MONACK, 2004; SERRANO, 2007).

Mundialmente, o câncer gástrico é a segunda maior causa de morte. Sabe-se que muitos fatores ambientais contribuem para o surgimento deste carcinoma gástrico, dentre eles, dietas com baixo consumo de frutas e vegetais (MEIRA *et al*, 2011), alto consumo de sal, nitritos, álcool, fumo, alguns medicamentos (HU *et al*, 2011), e, especialmente, a infecção por *H.pylori*, como citado anteriormente, um importante fator de risco para o desenvolvimento deste câncer devido a extensa inflamação gerada (KIM, 2012; ZENG *et al*, 2012).

O tratamento consiste em curar a úlcera péptica e reduzir o risco de câncer gástrico, a partir da inflamação crônica persistente. Dentre os fatores que afetam o tratamento estão a regionalidade, cultura e eficácia dos esquemas terapêuticos, tais como, número de antimicrobianos, uso de antissecretores e duração do tratamento (COELHO, 1990). Um dos regimes mais aceitos mundialmente consiste na terapia tripla com um inibidor da bomba de prótons mais dois antibióticos (WGO, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (WGO), a infecção por *H. pylori* está associada com a falta de saneamento adequado, água potável, higiene básica, dietas pobres e superpopulação. Pouco se sabe sobre a forma de contaminação por *H. pylori*. Segundo Khan *et al* (2012) a transmissão pode acontecer de forma iatrogênica, quando o instrumento para a realização de exames endoscópicos não são adequadamente higienizados, pelo contato entre pessoas, de mãe para filho, vômitos, saliva, diarreia, destacando-se a água contaminada por fezes, que por muitas vezes não tem atenção especial como fonte de contaminação por *H. pylori*. Um estudo realizado por Bonn (2000) identificou a presença de biofilmes de *H. pylori* na análise de água.

Apesar de acometer metade da população mundial a prevalência desta infecção é maior nos países em desenvolvimento. Na Nigéria, a infecção acomete mais que 95% dos adultos, enquanto que na Austrália apenas 20%. No Brasil, esta prevalência pode chegar a 82% dos adultos e 78% dos jovens (idade de 10-19 anos) (WGO, 2010). Segundo Datolli *et al* (2010), apesar da epidemiologia desta infecção ainda ser muito pouco estudada no Brasil, na população de Salvador estimou-se uma soroprevalência de 28,7% para a infecção por *H. pylori* em um estudo coorte em crianças.

Assim, a associação entre esses fatores ambientais foram positivamente associadas com a presença de anticorpos anti-*H. pylori* em um estudo realizado na cidade de Salvador por Datolli *et al* (2010). A geografia determina algumas frequências alélicas semelhantes interindivíduos que favorece uma expressão maior ou menor do câncer gástrico nestas populações infectadas (Won *et al*, 2010).

Um estudo conduzido por Zeng (2012) objetivou estudar infecção por *H. pylori* associada a polimorfismos *IL10* e o desenvolvimento do câncer gástrico numa área

de Hexi, na China, onde há uma alta taxa de morbidade e mortalidade por câncer no estômago. Observou-se que indivíduos com a presença dos alelos IL-10 -819C (rs1800871) e IL-10 -592C foram associados com aumento significativo do risco para o desenvolvimento de câncer em pacientes infectados por *H. pylori*. Na China, este tipo de câncer é mais frequente e letal, afirma Xue et al (2012).

O desenvolvimento da infecção está associada com fatores de virulência apresentadas pela *H. pylori* em certas linhagens que favorecem a infecção. Existem fatores intrínsecos associados a patogenicidade da bactéria que a auxiliam na modulação da resposta no hospedeiro. Dentre eles, está a forma espiralar, colonização, mobilidade, que contribuem para o início da infecção (LEE, 1993).

Há também o lipopolissacarídeo (LPS) e a habilidade para produzir urease, enzima que degrada a ureia em amônia e bicarbonato. A amônia é utilizada pela *H. pylori* como fonte de nitrogênio para síntese de proteínas, o bicarbonato atua removendo íons hidrogênio do ambiente gástrico acarretando no aumento do pH e favorecendo a colonização e a sobrevivência da bactéria na mucosa gástrica (MARSHALL et al 1990). A urease também é utilizada para testes rápidos no exame de endoscopia (WGO,2010).

Além destes, foram identificadas outras toxinas virulentas, de cepas patogênicas, tais como, a citotoxina associada ao antígeno (CagA) e a toxina vacuolar ou fator vacuolinizante associado a citotoxina A (VacA). Moléculas de adesão também estão presentes em estirpes virulentas, estas facilitam a persistência assintomática da *H. pylori* (BERGMAN et al 2006) a exemplo, a BabA, que favorece a adesão da bactéria nas células da mucosa gástrica (PRINZ et al, 2003) e OipA (TABASSAM et al, 2011).

CagA é um antígeno imunodominante (SERRANO, 2007) que induz a inflamação e a patogênese da *H. pylori* (DELAHAY, 2012). VacA é uma proteína secretora que, entre outras funções, induz vacuolinização celular em células epiteliais, formando grandes vacúolos (PRINZ,2003), mostrando-se por atuar na imunomodulação e interferindo com sinalização de IL-12 (MONACK,2004). A ilha de patogenicidade (PAI) libera a CagA nas células epiteliais gástricas e induz a secreção de IL-8 (DELAHAY, 2012). A ligação de BabA é importante para iniciar o contato dependente de sinalização por sistema de secreção Cag tipo IV (DELAHAY, 2012). O sistema secretor tipo IV transloca o CagA nas células do hospedeiro (ZENG,2012).

A OipA, proteína inflamatória exterior, em conjunto com o cag-PAI estimula a produção de interleucina 8 (IL-8) na mucosa gástrica. A IL-8 é um potente quimiotático para neutrófilos. A presença de ambos, cagA-PAI e OipA, parecem atuar através de vias distintas, mas resultam na ativação do fator regulador de interferon. Estes fatores de virulência são importantes desfechos na infecção por *H. pylori* (NAMARA e EL-OMAR, 2008).

Bodger *et al* (2001) postula que a IL-10 contribui para eliminar a infecção por *H. pylori*. Alguns estudos tem demonstrado aumento dos níveis desta citocina em cultura de biópsias infectadas por *H. pylori* (DE VITA, 1999). A secreção de IL-10 pode neutralizar a resposta imune na infecção, diminuindo assim, a lesão no tecido. Todavia, contribui para diminuir a lise do microorganismo, postula Bodger (2001).

2.2 - Resposta Imunológica

A infecção por *H. pylori* desencadeia no hospedeiro uma resposta imune tanto

inata quanto adquirida. A imunopatologia desta infecção envolve a mediação de citocinas, infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nas células da mucosa gástrica, assim como, indução de resposta humoral específica (BERGMAN *et al* 2006).

A resposta inata geralmente é inicial, não é específica. Ela reconhece e reage rapidamente a várias moléculas bacterianas para sinalizar o perigo infeccioso e ocasionar a lise das bactérias. O conhecimento de moléculas bacterianas pelo sistema imune inato é mediado por receptores Toll-like (TLRs), expressos em células apresentadoras de antígeno (APCs) tais como monócitos e células dendríticas (CDs). O contato da bactéria com estas células estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1, IL-8) e quimiocinas que estimulam o recrutamento de polimorfonucleares para o local da infecção a fim de eliminar a bactéria (BERGMAN *et al* 2006).

A exemplo, o lipopolissacarídeo é um importante componente estrutural das bactérias gram-negativas indutor e imunidade. Entretanto, estudos tem demonstrado que o LPS da *H. pylori* tem baixo poder endotóxico e atividade imunobiológica (MORAN, 1997; MUOTIALA, 1992), destacando-se assim, os fatores de virulência. Prinz *et al* (2003) sugere que existe uma interação entre *H. pylori* e o sistema imune humano no intestino.

Em contraste, a resposta imune adaptativa é retardada, específica para os epítomos característicos bacterianos. Esses antígenos, conduz à ativação de células T, B e de memória, e, é moldada pela resposta imune inata. A *H. pylori* tem evoluído em subverter não só a resposta inata como também, a adaptativa (MONACK, 2004; BERGMAN, 2006; PRINZ, 2003).

Após a infecção com a bactéria, proteínas bacterianas são fagocitadas por CDs e peptídeos bacterianos são expressos na superfície destas células, associados com MHC classe II. Esta apresentação de antígenos eficaz leva à ativação de células T CD4+ que reagem em relação a estes antígenos e desencadeiam a produção de anticorpos (MONACK, 2004; BERGMAN, 2006; PRINZ, 2003).

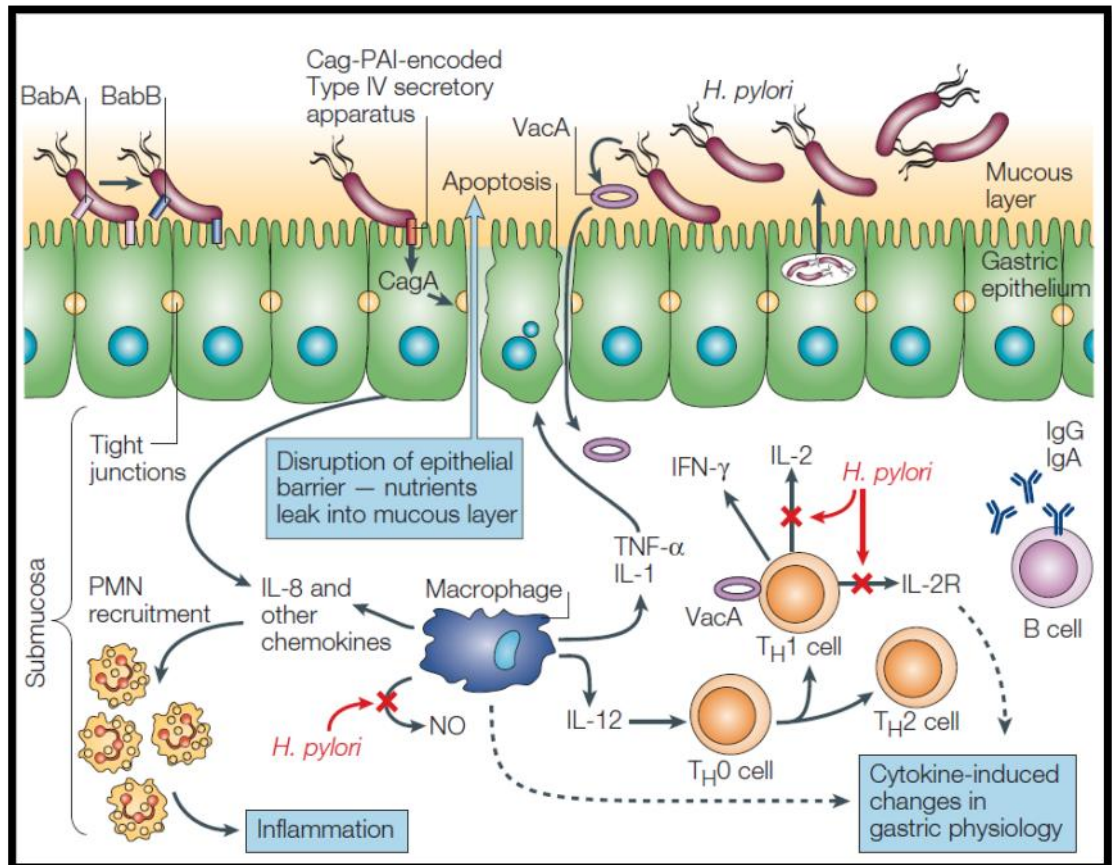


Figura I. Infecção persistente por *Helicobacter pylori*.

MONACK, et al. *Nature Reviews| Microbiology*. v. 2, p. 747, 2004.

Na resposta adquirida da infecção por *H. pylori* em ambas as fases aguda e crônica ocorre o envolvimento de células T auxiliares específicas contra a bactéria. Há dois padrões de células T auxiliares muito distintos em relação a produção de citocinas. Os diferentes padrões de citocinas conduzem a funções diferentes dos dois tipos de células T. As células T_{H1}, que secretam fator de necrose tumoral (TNF)

e interferon gama (IFN- γ), e, as células T_H2 que produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 estão envolvidas na regulação negativa de células T_H1 e facilita a produção de anticorpos pelas células B (ROMAGNANI, 1991; BERGMAN *et al*, 2006).

Na fase aguda, as células T_H1 objetivam lisar as células. Sendo assim, atuam na defesa celular contra patógenos intracelulares, mas, uma resposta exaustiva pode resultar em danos teciduais na mucosa gástrica. Na resposta crônica, ocorrem as respostas T_H1 e T_H2. As células T_H2 secretam interleucinas que estão envolvidas na regulação negativa de células T_H1 e em eventos inflamatórios (BERGMAN *et al*, 2006).

A Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir a secreção de outras citocinas em diferentes tipos de células T. A IL-10 inibe também fator de necrose tumoral (TNF α), IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 produzidos por monócito/macrófagos, interferon (IFN- γ) e IL-2, oriundos de células T (TURNER *et al*, 1997), IL-3 e GM-CSF (ZENG *et al*, 2012).

Na patogênese da infecção por *H. pylori*, as APCs através de sinais co-estimulatórios e da citocinas inibitórias, tal como IL-10, estimulam as células T CD4⁺ naive a se diferenciarem em células T_{reg} que estimulam ainda mais a produção da citocina IL-10 atuando assim, na regulação negativa de células T_H1, macrófagos e produção de anticorpos pelas células B (BERGMAN *et al* 2006). Dessa forma, a IL-10 tem uma habilidade para suprimir a apresentação de antígeno das células apresentadoras de antígeno da *H.pylori* (WU *et al*, 2002).

As citocinas também alteram a secreção de muco, o que contribui para a injúria induzida por *H. pylori* na mucosa, uma vez que induzem alterações na secreção gástrica de ácido e na homeostase. A *H. pylori* inibe a resposta imune do

hospedeiro através do bloqueio da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos e por meio da capacidade de VacA em interferir com a via de sinalização de IL-2 em células T (e, portanto, a ativação de células T), bloqueando transcrição dos genes que codificam IL-2 e o seu receptor, IL-2R (MONACK, 2008).

A mucosa gástrica infectada por *H. pylori* tem se mostrado associada com níveis aumentados de citocinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF e IL-10, os quais por sua vez funcionam como quimioatraentes local, induzindo a infiltração de granulócitos (SUGIMOT *et al*, 2006). Os monócitos podem diferenciar-se em macrófagos e destruir as bactérias por lise intracelular. Esta resposta pode ser considerada não-específica, mas é muito eficaz. No entanto, estudos tem demonstrado que a *H.pylori* pode sobreviver intracelularmente dentro de macrófagos, por interferir com as proteínas lisossômicas, semelhante à infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (RAMARO e MEYER, 2001).

A *H. pylori* liga-se as células epiteliais gástricas através da BabA e outras adesinas, em linhagens que possuem a ilha de patogenicidade Cag (Cag-PAI), aparato secretor tipo IV, esta, transloca a molécula efetora como o CagA sobre células do hospedeiro, resultando na produção de interleucina-8 (IL-8) e outras quimiocinas em células epiteliais. As quimiocinas secretadas recrutam polimorfonucleares (PMNs) resultando em inflamação (MONACK, 2004; BERGMAN, 2006; PRINZ, 2003).

O CagA injetado também atua sobre junções intercelulares, isso a longo prazo, promove a ruptura da barreira epitelial, alterações displásicas nas células e conseqüentemente alterações na morfologia celular. Isto promove o rompimento de junções celulares levando a perda de nutrientes e entrada do VacA. A VacA induz a apoptose em células epiteliais através da redução do potencial de membrana

mitocondrial e indução da libertação do citocromo c, o que também pode contribuir para a ruptura da barreira epitelial. A fase crônica da gastrite por *H. pylori* liga uma resposta adaptativa de linfócitos com a resposta inicial inata. As citocinas produzidas por macrófagos, particularmente IL-12, ativam as células recrutadas - tais como as células T auxiliares (MONACK, 2004; BERGMAN, 2006; PRINZ, 2003).

Na realidade, tem sido demonstrado que a *H. pylori* inibe a proliferação de linfócitos, mas a natureza exata deste efeito é desconhecido. Este achado explica a observação de que a resposta imune adaptativa é ineficaz e tem de ser aumentada por abordagens imunoterapêuticas (Meyer et al. (2000); Blanchard et al. (1999); Blaser (1993); Crabtree et al. (1995); Crabtree (1996); Ramarao e Meyer (2001).

2.3 – IL-10 e Susceptibilidade genética

Muitos indivíduos iniciam a colonização por *H. pylori* na infância, mas, apenas uma pequena parcela desta população desenvolve a doença. Isso pode ocorrer devido a virulência das estirpes. No entanto, estudos tem demonstrado a predisposição genética do hospedeiro associada a susceptibilidade a infecção por *H. pylori* (BERGMAN, 2006; PERSSON, 2011; ERNST,2000; SUTTON *et al*, 2000).

Dentre alguns genes envolvidos com o processo de imunorregulação associados a susceptibilidade genética por *H. pylori*, os mais frequentemente estudados são os genes do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e das interleucinas (IL1B, IL1RN, IL8, IL10) (MURPHY *et al*, 2009). No entanto, um gene que merece destaque é o que codifica para a citocina IL-10, pois, esta citocina é um importante mediador para a fisiopatologia do câncer gástrico e para a susceptibilidade a infecção (PERSSON, 2011).

O gene da citocina regulatória IL-10 tem sido bastante estudado, e, tem mostrado que este gene é altamente polimórfico. Polimorfismo de nucleotídeo simples (SNPs) tem sido identificados na região promotora do gene da IL-10. Evidências tem demonstrado que estes polimorfismos estão associados com a patogênese do câncer gástrico (ZENG *et al*, 2012) por uma diminuição na produção desta citocina (EL-OMAR *et al*, 2003).

Estudo realizado por EL-OMAR *et al* (2003) identificou a associação de três polimorfismos no gene *IL10* nas posições -592 (rs1800872), -819 (rs1800871) e -1082 (rs1800896) com o risco aumentado para o desenvolvimento de câncer gástrico em pacientes infectados por *H. pylori*. E, segundo ZENG (2012), pacientes

que possuem o alelo IL-10 -1082 G estão associados com uma maior produção de IL-10.

Os polimorfismos da IL-10 são de particular interesse em relação ao câncer, porque IL-10 tem ação imunossupressora e efeitos antiangiogênicos (potencialmente inibição para o câncer). Os polimorfismos no gene da IL-10 podem alterar a produção da interleucina, bem, como a sua função e/ou atividade (SUAREZ, 2003). Dessa forma, é possível que polimorfismos no gene da IL-10 tenham um papel na susceptibilidade ao câncer, na modulação e no desenvolvimento do tumor, afirma HOWELL *et al* (2007).

A Interleucina-10 é uma potente citocina pleiotrópica com várias funções, onde destaca-se sua capacidade de imunomodulação (HUNNINGHAKE *et al*, 2008). A IL-10 é produzida por células T regulatórias, células B, monócitos, macrófagos alveolares, mastócito, células dendríticas (HUNNINGHAKE ET AL, 2008). É produzida por uma variedade de células em resposta a um estímulo de ativação, porém, regulada por diferentes mecanismos. A IL-10 inibe a secreção e a produção de IL-1, outras quimiocinas implicadas no recrutamento de macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-6, IL-8 e IL-12 oriundo de monócitos/macrófagos, interferon γ (IFN- γ), IL-12 oriundo de células T e citocinas do perfil T_H2. Os níveis de produção de IL-10 controlam o balanço entre a resposta inflamatória e humoral, modulão as respostas T_H1 e T_H2. (TURNER, 1997; BERGMAN, 2006). A IL-10 também inibe a produção de prostaglandina E2 (expressão da ciclooxygenase 2) e expressão de MHC II (MOORE *et al*, 2008).

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1 entre 1q31 e 1q32, codificado por cinco exons e quatro introns. Aproximadamente três quartos da variabilidade interindividual da IL-10 estão associados com variações genéticas

(SUGIMOT *et al*, 2006; TURNER, 1997). O gene da IL-10 é altamente polimórfico e certos haplótipos resultam em diferentes níveis de expressão dessa citocina. O haplótipo GCC tem sido associado com elevada produção de IL-10 (LUNG, 2011).

Foram descritos diversos polimorfismos, sendo que os que ocorrem nas posições -1082G/A, -819C/T e -592C/A estão relacionados com maior ou menor produção da IL-10. Apesar de o câncer gástrico estar associado a fatores ambientais, genéticos e dieta, exposição a *H. pylori* implica numa via susceptível ao desenvolvimento do câncer gástrico. Logo, por se tratar de um problema de saúde pública é que estudos que tendem a esclarecer os mecanismos relacionados a esta infecção e susceptibilidades genéticas, são de grande importância para a ciência atualmente, justificando-se o presente trabalho.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESE

Polimorfismos no gene *IL10* contribuem na expressão da citocina IL-10 favorecendo a infecção por *Helicobacter pylori*.

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de determinados polimorfismos no gene da IL-10 em uma população (n=1.353) de crianças (4-11 anos) residentes em Salvador-BA, Brasil e avaliar a associação entre tais polimorfismos, produção de IL-10 espontânea e desenvolvimento de infecção por *Helicobacter pylori*.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a frequência de polimorfismos no gene da IL-10 numa população de 1.353 crianças residentes em Salvador-BA.
- ✓ Avaliar a associação entre estes polimorfismos do gene *IL10* e infecção por *H. pylori*;
- ✓ Avaliar a produção de IL-10 espontânea em crianças infectadas e não infectadas com *H. pylori*;
- ✓ Avaliar associação entre polimorfismos do gene *IL10* e produção espontânea de IL-10.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Variantes genéticas sobre o gene *IL10*, produção de IL-10 e infecção por *Helicobacter pylori*

S Assis¹, CR Marques¹, RS Costa¹, NM Alcantara-Neves¹, ML Barreto², KC Barnes³, CA Figueiredo^{1*}.

¹Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, BA, Brasil; ²Instituto de Saúde Coletiva, UFBA, Salvador, BA, Brasil; ³Division of Allergy and Clinical Immunology, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.

***Correspondências:** Camila Alexandrina V. Figueiredo, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon, s/ n, Canela CEP – 40110-100, Salvador, Bahia, Brasil.
E-mail: cavfigueiredo@gmail.com

JORNAL: HELICOBACTER

FATOR DE IMPACTO: 3.151

RESUMO

Introdução: A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um alto fator de risco para o cancer gástrico, provavelmente devido à extensa inflamação na mucosa do estômago causada por esta bactéria. Muitos estudos tem relatado uma associação entre polimorfismos *IL10*, risco de cancer gástrico e produção de IL-10. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre variantes genéticas *IL10*, infecção por *H. pylori* e produção de IL-10 por leucócitos do sangue periférico em crianças.

Materiais e Métodos: Foram genotipados um total de 12 SNPs em *IL10* em 1,353 crianças com idade entre 4-11 anos vivendo em uma área urbana da cidade de Salvador, Brasil, utilizando sonda TaqMan. Testes de associação foram realizadas por meio de regressão logística para a infecção por *H. pylori* e de regressão linear para a produção de IL-10 espontânea (culturas de sangue total), incluindo sexo, idade e componentes principais para os marcadores de ancestralidade como co-variáveis, utilizando PLINK.

Resultados: Nossos resultados mostraram que os SNPs rs1800896 (OR: 1,249; IC 95%: 1,031-1,513), rs3024491 (OR: 1,233; IC 95%: 1,013-1,502), rs1878672 (OR: 1,217 95% IC: 0,9995-1,481) em *IL10* foram associados positivamente com a exposição à infecção por *H. pylori*. Um total de oito SNPs foram associados com a produção espontânea de IL-10. Alguns desses SNPs que foram fortemente associadas com a infecção por *H. pylori*, também têm sido associados com a produção espontânea de IL-10 em cultura ($p = 0,04$ para rs1800896 e rs1878672, e $p = 0,01$ para rs3024491).

Conclusão: Nos resultados obtidos, podemos sugerir que as variantes rs1800896, rs3024491 e rs1878672 são mais consistentemente associada com a presença de anticorpos IgG anti-*H. pylori* através da indução de um aumento da produção de IL-10. Novos estudos devem ser realizados para elucidar o papel de outras variantes, bem como investigar o seu impacto sobre a ocorrência de câncer gástrico.

Palavras Chaves: *IL 10* gene, *H. pylori*, polimorfismos *IL 10*

INTRODUÇÃO

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria que afeta cerca de 50% da população no mundo. Estudos têm relatado uma associação entre infecção gástrica por *H. pylori* e os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (KIM et al, 2012). O câncer gástrico tem sido classificado como a segunda principal causa de morte por câncer em todo o mundo (ZENG, 2012). Estudos sobre o desenvolvimento do câncer gástrico sugerem que a predisposição genética e a infecção são partes de uma complexa interação com o sistema imunitário do hospedeiro (Kim et al, 2012; MONACK et al, 2004).

As condições de higiene são importantes para a aquisição da infecção (DATOLLI, 2010). A *H. pylori* afeta metade da população mundial. No entanto, a prevalência desta infecção é maior nos países em desenvolvimento. No Brasil, a prevalência pode chegar a 82% em adultos e 78% em jovens (idade 10-19 anos) (WGO, 2010). Em Salvador, uma cidade localizada no nordeste do Brasil, foi encontrada uma soropositividade de 28,7% (DATOLLI, 2010).

A *H. pylori* utiliza vários mecanismos para evadir ou reduzir as respostas imunes tanto inata quanto adaptativa do hospedeiro. No entanto, os dados indicam que uma resposta exaustiva do tipo T_H1 no estômago infectado pode resultar na destruição do tecido da mucosa (BERGMAN, 2006). A IL-10 tem a habilidade para inibir a secreção de citocinas a partir de células T auxiliar do tipo I (T_H1) (TURNER, 1997) e, por sua vez impede a inflamação e favorece a infecção.

Os níveis de IL-10 são, portanto, crucial na regulação imune, controlando o equilíbrio entre as respostas inflamatórias e humoral, e, modulação do balanço de células T_H1 e T_H2 durante a infecção (TURNER, 1997; BERGMAN, 2006). A IL-10 tem uma potente habilidade para suprimir a capacidade de apresentação de células

apresentadoras de antígenos (ZENG, 2012). Bodger et al (2001) relataram uma maior produção de IL-10 em indivíduos infectados com *H. pylori* do que os não-infectados.

Polimorfismos no gene IL-10, foram identificados e estão associados com o aumento da produção de IL-10 (SUAREZ, 2003). Muitos pesquisadores têm relatado a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês *single nucleotide polymorphisms* - SNPs) em genes que regulam a resposta inflamatória do hospedeiro e o câncer gástrico (PERSSON, 2011). SNPs sobre *IL10* foram relatados por aumentar os riscos de gastrite crônica e o desenvolvimento de carcinoma gástrico (EL- OMAR, 2003).

Considerando o impacto da infecção por *H. pylori* e a ausência de estudos genéticos nos países em desenvolvimento, que apresentam alta prevalência desta infecção, por este ser um cenário perfeito para explorar a genética da infecção neste ambiente particular, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de polimorfismos no gene *IL10* numa população (n = 1.353) de crianças (4-11 anos) que vivem em Salvador, Bahia, Brasil, a fim de avaliar a associação entre polimorfismos neste gene, produção espontânea de IL-10 e a presença de anticorpos IgG para *Helicobacter pylori*.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

Este estudo foi conduzido na cidade de Salvador no Nordeste do Brasil, com uma população de 2,5 milhões. A concepção geral do estudo foi reportada em outros estudos (FIGUEIREDO, 2010; 2009; RODRIGUES et al, 2008). Em suma, a população do estudo incluiu 1.445 crianças sem relação entre 4-11 anos de idade recrutados na infância para um estudo prospectivo a fim de avaliar o impacto de um programa de saneamento básico em toda a cidade sobre a morbidade infantil (BARRETO, 2010). A aprovação ética para o estudo foi obtido a partir da Comitê de Ética Nacional Brasileiro e o consentimento informado foi obtido pelo responsável legal de cada criança. Os dados foram coletados a partir de crianças nascidas entre 1994 e 2001, que viviam em bairros sentinela na cidade. Questionários padronizados foram administrados para os responsáveis legais das crianças entre 1997 e 2003 para coletar os dados sobre variáveis demográficas e sociais, bem como no ambiente doméstico. As crianças foram entrevistadas novamente em 2005 para coletar as mesmas variáveis, amostras de sangue para extração de DNA, cultura de sangue total para IL-10 e coleta do soro para exames sorológicos.

Avaliação dos níveis de IL-10 por ELISA

A produção espontânea de IL-10 foi mensurada no sobrenadante de culturas de sangue total não estimuladas utilizando pares de anticorpos comercialmente disponíveis e padrão da citocina recombinante (BD Pharmingen San Diego, CA, EUA) por ELISA sanduíche, de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações de IL-10 foi determinada por interpolação das curvas padrão. Os

limites de detecção (baixo / alto) foram 31.25/500 pg/mL. Um total de 1.356 crianças foi avaliado para a produção de IL-10.

Detecção sorológica de IgG anti-*H. pylori*

A presença destes anticorpos no soro foi determinada por ELISA, utilizando um kit disponível comercialmente (Diamedix, Miami, FL, EUA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ponto de corte foi determinado por um valor obtido pela razão da absorvância da amostra com a absorvância de um calibrador (uma solução contendo soro ou plasma humano desfibrinado, com anticorpos IgG fracamente reativos com *H. pylori* e azida de sódio a 0,1%). Uma razão > 1.1 foi considerado positivo. Indivíduos limítrofes foram removidos da análise (DATOLLI et al, 2010).

Genotipagem

Doze polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) *IL10* foram selecionados para a genotipagem. Uma análise de “tagging SNPs” sugeriu 5 SNPs que capturam 100% da variação genética no gene da IL-10 , uma região ~ 4,89 Kbp no cromossomo 1, considerando as seguintes populações padrões: ancestral Europeu CEPH (CEU) e Africana (Yoruba em Ibadan, Nigéria) do HapMap ([http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov /](http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Além disso, 7 SNPs com associações prévias com fenótipos relacionados (rs1800871, rs1800872, rs1800896, rs3024491, rs3024492, rs3024495 e rs3024496) foram incluídos, mesmo que eles estavam em alto desequilíbrio de ligação (do inglês Linkage Disequilibrium - LD) com o 5 tag SNPs selecionados. O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico, utilizando protocolo padrão comercializado

(Gentra® Puregene® Sangue Kit Quiagen). Os SNPs foram genotipados utilizando a sonda TaqMan™ (BARRETO et al, 2010) no sistema de detecção de seqüência de 7900HT (Applied Biosystems-ABI, Foster City, Califórnia, EUA). Os primers e sondas de TaqMan® foram fabricados pela Applied Biosystems (Applied Biosystems).

A PCR foi realizada em um volume de 5 µl utilizando uma *master mix* universale primers para detecção dos SNPs (lista de SNPs-Tabela 1). As condições de ciclos térmicos foram: 95°C durante 10 min seguida por 40 ciclos de 95°C durante 15s/60°C durante 1 min e uma extensão de 60°C durante 5 min. Controles negativos e controles positivos foram incluídos em cada placa de genotipagem. Os genótipos foram determinados automaticamente pela máquina (AB 7900) com um valor de qualidade/confiança de acima de 99%.

Dez por cento das amostras foram genotipadas em duplicata com 100% de reprodutibilidade. Todos os 12 SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os 12 SNPs estudados estão resumidas na Tabela I.

Tabela I. SNPs incluídos neste estudo

SNP	Posição cromossômica	Alelo	Localização gênica
rs1800896	206946897	C/T	5'UTR
rs3024491	206945046	A/C	Intron
rs1878672	206943713	C/G	Intron
rs3024496	206941864	G/A	Exon
rs3024495	206942413	T/C	Intron
rs3024492	206944112	A/T	Intron
rs3024505	206939904	A/G	Abaixo
rs1800872	206946407	T/G	5'UTR
rs1518111	206944645	T/C	Intron
rs1554286	206944233	A/G	Intron
rs1800871	206946634	A/G	5'UTR
rs3024498	206941529	C/T	3'UTR

Análise estatística

As análises foram realizadas por associações genéticas por meio de regressão logística (modelo aditivo, com exceção de SNPs com MAF $<0,1$, onde foi utilizado o modelo dominante), incluindo sexo e idade como co-variáveis. Além disso, para corrigirmos os potenciais efeitos da estratificação da população, os dois primeiros componentes principais (PCs) delineado via Eigenstrat em 269 marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) foram incluídos no modelo. Para dados contínuos, tais como níveis de IL-10, as análises foram realizadas por meio de regressão linear, ajustada por sexo, idade e componentes principais.

Ambas as análises foram realizadas considerando permutações adaptativas (EMP1). Processos de permutação proporcionam uma abordagem computacionalmente intensiva para gerar níveis de significância empiricamente. Esses valores têm propriedades desejáveis: por exemplo, relaxar suposições sobre a normalidade dos fenótipos contínuos e equilíbrio de Hardy-Weinberg, lidando com alelos raros e pequenas amostras, fornecendo um quadro para a correção de testes múltiplos e controlando para identificar infra-estrutura ou relações familiares permutando apenas dentro do grupo (PURCELL et al, 2007).

Todas as análises genéticas foram realizadas utilizando PLINK e o gráfico de IL-10 entre indivíduos infectados e não infectados foi construído usando STATA 8.2 (StataCorp LP, College Station, TX, EUA).

RESULTADOS

A Tabela II sumariza as características da população do estudo incluindo sexo, idade e infecção por *H. pylori*. Como pode ser visto na Tabela II, 55,40% das crianças do são do sexo masculino, a maioria estava entre 6 e 7 anos de idade (35,52%) e a presença de anticorpos IgG anti-*H. pylori* foi de 28,04%. De agora em diante, neste estudo a presença de anticorpos IgG *H. pylori* foi considerada uma representação da infecção.

Tabela II. Características da população estudada

	N (%)
Sexo (n=1,343)	
Feminino	603 (44.60%)
Masculino	749 (55.40%)
Idade (n=1.352)	
≤ 5a	472 (35.15%)
6-7 a	477 (35.52%)
≥ 8a	394 (29.34%)
IgG anti-<i>H. pylori</i> (n=1.259)	
Infectados	353 (28.04%)
Não-infectados	906 (71.96%)

A figura I mostra as diferenças na produção de IL-10, entre indivíduos infectados por *H. pylori* e indivíduos não infectados por *H. pylori*. Os indivíduos infectados apresentaram uma tendência ao aumento da produção de IL-10, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

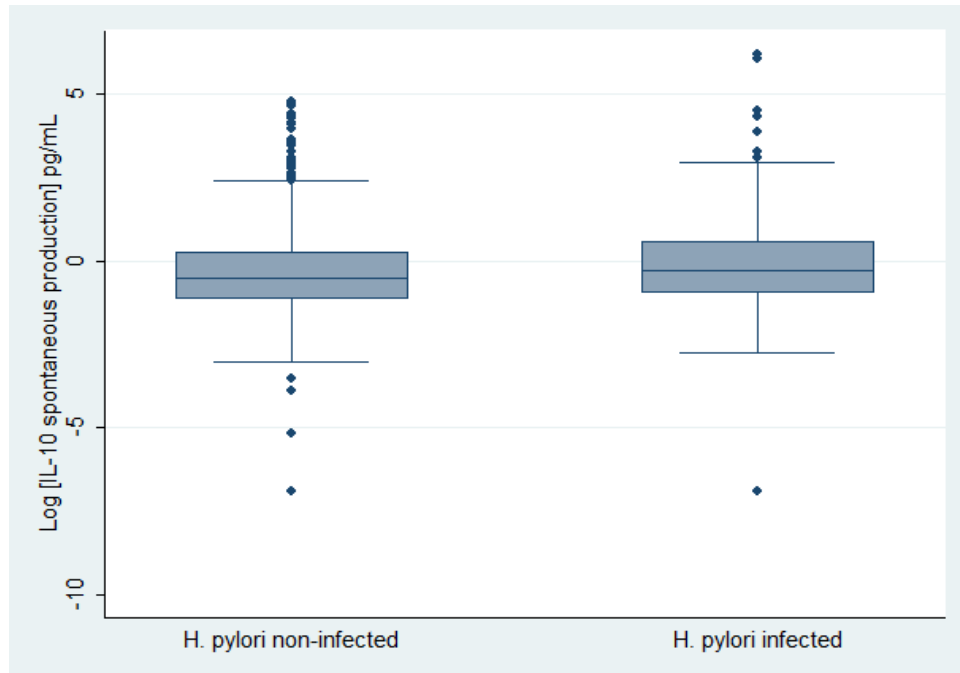


Figura I. Produção espontânea de IL-10 entre indivíduos infectados ou não infectados por *H. pylori*

A tabela III mostra as associações entre SNPs *IL10* e produção espontânea de IL-10. Um total de 8 associações significativas foram encontradas. Entre eles, foram observadas associações negativas estatisticamente significantes para os SNPs rs1518111 ($\beta = -0,077$, $p < 0,001$), rs1800872 ($\beta = -0,076$, $p < 0,001$), rs1800871 ($\beta = -0,071$, $p < 0,001$) e rs1554286 ($\beta = -0,066$, $p < 0,001$). Associações positivas foram observadas para SNPs rs3024496 ($\beta = 0,058$, $p = 0,003$), rs3024491 ($\beta = 0,050$, $p = 0,014$), rs1878672 ($\beta = 0,043$, $p = 0,036$) e rs1800896 ($\beta = 0,043$, $p = 0,036$). Para os demais SNPs não foram observadas associações estatisticamente significantes.

Tabela III. Associação entre SNPs *IL10* e produção espontânea de IL-10

SNP	β	p Value
rs1518111	-0.077	<0.001
rs1800872	-0.076	<0.001
rs1800871	-0.071	<0.001
rs1554286	-0.066	<0.001
rs3024496	0.058	0.003
rs3024491	0.050	0.014
rs1878672	0.043	0.036
rs1800896	0.040	0.042
rs3024498	-0.041	0.111
rs3024492	-0.059	0.136
rs3024495	-0.043	0.272
rs3024505	-0.017	0.629

A tabela IV mostra uma associação entre os SNPs *IL10* e infecção por *H. pylori* (IgG anti-*H. pylori*). Associações positivas foram observadas para os SNPs rs1800896 (OR = 1,249, IC 95% = 1,031 - 1,513, p = 0,023) e rs3024491 (OR = 1,233, IC 95% = 1,013 - 1,502, p = 0,036). O rs1878672 (OR = 1,217, IC 95% = 0,999 - 1,481, p = 0,050) foi *borderline* com IgG anti-*H. pylori*, indicando uma possível associação deste SNP com a infecção. Para os demais SNPs, não houve associação estatisticamente significativa.

Tabela IV. Associação entre SNPs *IL10* e infecção por *H. pylori*

SNP	OR	95%IC	pValor
rs1800896	1.249	1.031 – 1.513	0.023
rs3024491	1.233	1.013 – 1.502	0.036
rs1878672	1.217	0.999 – 1.481	0.050
rs3024496	1.177	0.978 – 1.417	0.084
rs3024495	1.274	0.894 – 1.815	0.178
rs3024492	1.221	0.845 – 1.763	0.285
rs3024505	1.141	0.798 – 1.630	0.467
rs1800872	0.934	0.778 – 1.123	0.469
rs1518111	0.936	0.778 – 1.127	0.487
rs1554286	0.962	0.798 – 1.160	0.685
rs1800871	0.975	0.812 – 1.172	0.791
rs3024498	0.980	0.763 – 1.259	0.878

DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças na produção de IL-10 entre indivíduos infectados e não infectados por *H.pylori* (Figura I). O grupo de indivíduos infectados apresentaram uma tendência ao aumento da produção de IL-10, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Esta tendência confirma os dados encontrados por De Vita et al (1999), num estudo de culturas de células infectadas com *H. pylori* em que foi demonstrado um aumento na produção de IL-10 entre indivíduos infectados. Bodger et al (2001) também relataram uma maior produção de IL-10 em indivíduos infectados com *H. pylori* do que em indivíduos não infectados e aqueles com gastrite por *Helicobacter*-negativo. Assim, sugerimos que os indivíduos infectados apresentam uma tendência para aumentar a produção de IL-10.

Associações também foram observadas entre os SNPs *IL10* e produção espontânea de IL-10 por análise de regressão linear (Tabela III). O valor de β negativo indica que as associações foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$) para SNPs rs1518111, rs1800872, rs1800871 e rs1554286, que nos levou a acreditar que essas variantes estão associadas à diminuição da produção de IL-10 espontaneamente em indivíduos portadores os alelos raros. Chen et al (2012) também encontraram que os níveis de IL-10 foram significativamente menores entre os indivíduos com o genótipo AA para o polimorfismo na posição -592 (rs1800872).

Uma associação positiva foi observada para os SNPs rs3024496, rs3024491, rs1878672 e rs1800896 (Tabela III). Estes dados mostram uma combinação de SNPs com o aumento da produção de IL-10 espontaneamente. Polimorfismos no gene da IL-10 podem alterar a produção de interleucina, bem como a sua função e / ou atividade (SUAREZ, 2003). O SNP rs1800896 (-1082 A) mostrou significativamente elevada produção da proteína IL-10 (TURNER, 1997) e para

Suarez et al (2003) os resultados mostram também que os indivíduos normais, com o alelo G na posição -1082 foi o fator genético mais importante na regulação dos níveis de RNAm para IL-10 constitutiva.

Analisando a associação entre os SNPs *IL10* e infecção por *H. pylori* (presença de anticorpos IgG anti-*H. pylori*) associações positivas foram observadas para os SNPs rs1800896, rs3024491 sugerindo que a presença destas SNPs está associada com a susceptibilidade à infecção por *H. pylori*. Os nossos dados mostraram que os SNPs rs1800896, rs3024491 foram associados positivamente com o aumento da produção de IL-10 (Tabela III), assim, estes resultados sugerem que os níveis elevados de citocinas podem contribuir para susceptibilidade à infecção por *H. pylori*. Estudos anteriores demonstraram que elevados níveis de IL-10 pode estar associada com diferentes tipos de infecções por bactérias gram-positivas e gram-negativas (MARCHANT et ai. 1994), fúngicos (Vecchiarelli et ai. 1996) e infecções da dengue (Green et al 1999). O rs1878672 foi *borderline* associado com a infecção por *H. pylori*, que mostra uma possível tendência deste SNP estar associado com a infecção.

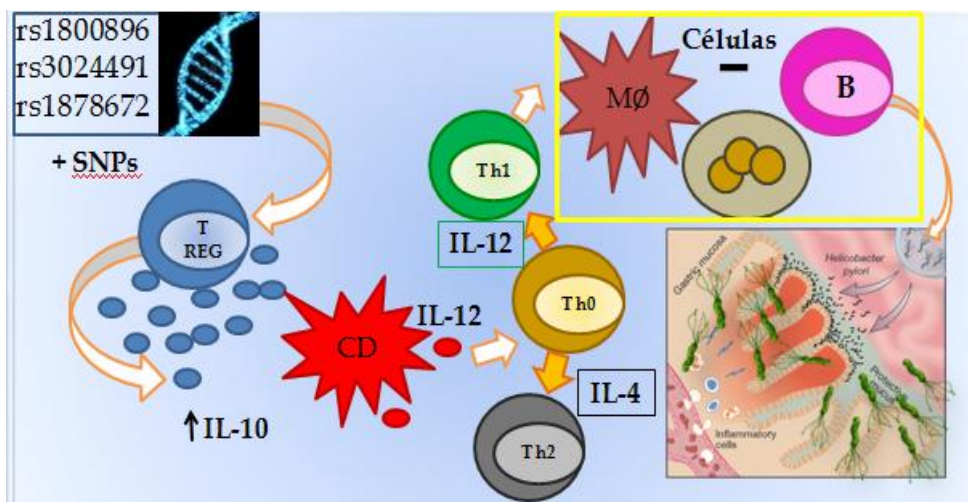


Figura II. Regulação dos SNPs e a infecção por *H. pylori*

Na Figura II ilustramos um mecanismo entre a regulação dos SNPs e a infecção por *H. pylori*. Os indivíduos que expressam os SNPs rs1800896, rs3024491, rs1878672 contribuem para a diferenciação de células T naive em células Treg. Estas células, T_{reg}, estimulam o aumento da expressão de IL-10. As células dendríticas na presença da IL-12 estimulam a produção autócrina de IL-4 pelas células T CD4 naive⁺. As células T é inibida, e IL-12 auxilia na diferenciação dessas células T em células T_H1 que produzem IFN γ e ativa as funções de macrófagos. Desta forma, as células T naive que se diferenciam em células T_H2 efetoras induzem a diferenciação de células B e inibem as funções dos macrófagos. Assim, a inibição dos macrófagos favorece a permanência da infecção por *H. pylori*.

Dos resultados obtidos, podemos sugerir que as variantes rs1800896, rs3024491 e rs1878672 são mais consistentemente associada com a presença de anticorpos IgG anti-*H. pylori*. Estes SNPs através da indução de um aumento de produção de IL-10 favorecem ao aumento da infecção. Novos estudos devem ser realizados para elucidar o papel de outras variantes, bem como investigar o seu impacto sobre a ocorrência de câncer gástrico.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Wellcome Trust, Reino Unido e as agências brasileiras CAPES, CNPQ e FAPESB por providenciarem bolsas de estudo para os autores e apoiarem este trabalho.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Genetic Variations on *IL10* Gene, IL-10 production and *Helicobacter pylori* Infection

S Assis¹, CR Marques¹, RS Costa¹, NM Alcantara-Neves¹, ML Barreto², KC Barnes³, CA Figueiredo^{1*}.

¹Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, BA, Brasil; ²Instituto de Saúde Coletiva, UFBA, Salvador, BA, Brasil; ³Division of Allergy and Clinical Immunology, The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA.

***Corresponding author:** Camila Alexandrina V. Figueiredo, Health Science Institute
Federal University of Bahia Av. Reitor Miguel Calmon, s/ n, Canela
ZIP Code – 40110-100,
Salvador, Bahia, Brazil.
E-mail: cavfigueiredo@gmail.com

JOURNAL: HELICOBACTER

IMPACT FACTOR: 3.151

ABSTRACT

Background: The *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a strong risk factor for gastric cancer, likely due to the extensive inflammation in the stomach mucosa caused by this bacteria. Many studies have reported an association between *IL10* polymorphisms and the risk of gastric cancer and IL-10 production. The aim of the study was to evaluate the association between *IL10* genetic variants, *H. pylori* infection and IL-10 production by peripheral blood leukocytes in children.

Materials and Methods: We genotyped a total of 12 SNPs on *IL10* in 1.353 children aged 4-11 years living in a poor urban area in Salvador, Brazil, using TaqMan probe based, 5' nuclease assay minor groove binder chemistry. Association tests were performed by logistic regression for *H. pylori* infection and linear regression for IL-10 spontaneous production (whole blood cultures) including sex, age and principal components for informative ancestry markers as covariates, using PLINK.

Results: Our results shown that SNPs rs1800896 (OR: 1.249; 95% CI: 1.031-1.513), rs3024491 (OR: 1.233; 95% CI: 1.013-1.502), rs1878672 (OR: 1.217; 95% CI: 0.9995-1.481) on *IL10* were positively associated with exposure to *H. pylori* infection. A total of eight SNPs were associated with IL-10 spontaneous production. Some of these SNPs that were strongly associated with infection by *H. pylori* have also been associated with the spontaneous production of IL-10 in culture ($p = 0.04$ for rs1800896 and rs1878672, and $p = 0.01$ for rs3024491).

Conclusions: From our results, we suggest that variants rs1800896, rs3024491 and rs1878672 are more consistently associated with the presence of IgG anti-*H.pylori* by inducing increased production of IL-10. Further studies should be conducted to elucidate the role of other variants as well as investigate their impact on the occurrence of gastric cancer.

Keywords: *IL 10* gene, *H. pylori*, *IL 10* polymorphisms

INTRODUCTION

The *Helicobacter pylori* is a bacteria that affects about 50% of the normal world population. Studies have reported an association between *H. pylori* gastric infection and the risk factor for development of gastric cancer (KIM et al, 2012). Gastric cancer has been ranked as the second leading cause of death from cancer worldwide (ZENG, 2012). Studies on the development of gastric cancer suggested that genetic predisposition and infection are parts of a complex interaction with the host immune system (KIM et al, 2012; MONACK *et al*, 2004).

Hygiene conditions are important to acquisition of infection (DATOLLI, 2010). The *H. pylori* affects half the world's population. However, the prevalence of this infection is higher in developing countries. In Brazil, this prevalence may reach 82% in adults and 78% among people (age 10-19 years) (WGO, 2010). In Salvador, a city located in northeastern Brazil, was found a seropositivity of 28.7% (DATOLLI, 2010).

H. pylori uses several mechanisms to evade or down-regulate both innate and adaptive host immune responses. However, data indicate that an exhaustive T_H1-type response in the infected stomach can result in destruction of mucosal tissue (BERGMAN, 2006). IL-10 has the ability to inhibit the secretion of cytokines from T helper type I (T_H1) (TURNER, 1997) and in its turn prevent inflammation and favors infection.

Levels of IL-10 production are therefore critical in immune regulation, controlling the balance between inflammatory and humoral responses and modulation of the balance of T_H1 and T_H2 cells during the infection (TURNER, 1997; BERGMAN, 2006). IL-10 also displays potent abilities to suppress the antigen presentation capacity of antigen presenting cells (ZENG, 2012). Bodger et al (2001)

reported higher production of IL-10 in *H. pylori*-infected individuals than in non-infected.

Polymorphisms on *IL10* gene have been identified and are associated with increased IL-10 production (SUAREZ, 2003). Many investigators have reported associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes that regulate the host's inflammatory response and gastric cancer (PERSSON, 2011) and SNPs on *IL10* were further reported to increase the risks of both chronic gastritis and gastric carcinoma development (EL-OMAR, 2003)

Considering the impact of *H. pylori* infection and the absence of genetics studies on developing countries which display high prevalence of this infection being a perfect scenario to explore the genetics of the infection in this particular environment, the aim of this study was to evaluate the presence of polymorphisms in the *IL10* gene in a population (n = 1,353) of children (4-11 years) living in Salvador, Bahia, Brazil, in order to evaluate the association between these polymorphisms, spontaneous production IL-10 and the presence of *Helicobacter pylori* IgG antibodies.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This study was conducted in the city of Salvador in Northeastern Brazil, with a population of 2.5 million. The general study design has been reported elsewhere (FIGUEIREDO, 2010; 2009; RODRIGUES et al, 2008). In short, the study population included 1.445 unrelated children between 4-11 years old recruited in infancy for a prospective study measuring the impact of a citywide sanitation program on childhood morbidity (BARRETO, 2010). Ethical approval for the study was obtained from the Brazilian National Ethical Committee and written informed consent was obtained from the legal guardian of each child. Data were collected from children born between 1994 and 2001 who lived in sentinel neighborhoods in the city. Standardized questionnaires were administered to the children's guardians between 1997 and 2003 (baseline) to collect data on demographic and social variables as well as on the home environment. Children were surveyed again in 2005 to collect the same variables and blood samples for DNA extraction, whole blood culture for IL-10 measurement and serum collection for serological examination.

IL-10 measurement by ELISA

Spontaneous IL-10 concentration was measured in non-stimulated whole blood culture supernatants using commercially available antibody pairs and recombinant cytokine standards (BD Pharmingen San Diego, CA, USA) by sandwich ELISA, according to the manufacturer's instructions. Cytokine concentrations were determined by interpolation of standard curves. Detection limits (low/high) were 31.25/500 pg/mL. A total of 1.356 children were assayed for IL-10 levels.

Serological Detection of Anti-*H. pylori* IgG

The presence of these antibodies in serum was determined by ELISA using a commercially available kit (Diamedix, Miami, FL, USA), following the directions provided by the supplier. The cut-off was determined by an index value obtained by the ratio of sample absorbance to the absorbance of a calibrator (a solution containing human serum or defibrinated plasma, with IgG antibodies weakly reactive with *H. pylori* and 0.1% sodium azide). A ratio >1.1 was considered positive. Borderline subjects were removed from the analysis (DATOLLI et al, 2010).

Genotyping

Twelve IL10 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected for genotyping. A tagging approach suggested 5 SNPs captured 100% of the genetic variation in a ~ 4.89 Kbp region on chromosome 1 in the European ancestry CEPH (CEU) and African (Yoruban in Ibadan, Nigeria) YRI populations in HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

In addition, 7 SNPs with prior associations with related phenotypes (rs1800871, rs1800872, rs1800896, rs3024491, rs3024492, rs3024495 and rs3024496) were included, even though they were in high LD (Linkage Disequilibrium) with the 5 tag SNPs selected. DNA was extracted from peripheral blood samples using commercial standard protocols (Gentra® Puregene® Blood Kit Quiagen). SNPs were typed using the TaqMan™ probe based, 5' nuclease assay minor groove binder chemistry (BARRETO et al, 2010) on the 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems-ABI, Foster City, Calif., USA). TaqMan® validated assays and master mix were manufactured by Applied Biosystems (Applied Biosystems).

PCR was conducted in a 5- μ l volume using a universal master mix, predesigned and validated TaqMan® assays for the SNPs (list of SNPs –Table 1). The thermal cycling conditions were: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s /60°C for 1 min and an extension step of 60°C for 5 min. Nontemplate negative controls and genotyping-positive controls were included in each genotyping plate. Automatic calling was performed with a quality value above 99%.

Ten percent of the samples were genotyped in duplicate with 100% reproducibility. All 12 SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium. Allele frequencies of the 12 SNPs are summarized in Table I.

Table I. SNPs included in this study

SNP	Chromosome position	Allele	Gene location
rs1800896	206946897	C/T	5'UTR
rs3024491	206945046	A/C	Intronic
rs1878672	206943713	C/G	Intronic
rs3024496	206941864	G/A	Exonic
rs3024495	206942413	T/C	Intronic
rs3024492	206944112	A/T	Intronic
rs3024505	206939904	A/G	Downstream
rs1800872	206946407	T/G	5'UTR
rs1518111	206944645	T/C	Intronic
rs1554286	206944233	A/G	Intronic
rs1800871	206946634	A/G	5'UTR
rs3024498	206941529	C/T	3'UTR

Statistical analysis

Analyses were conducted for genetic associations using logistic regression (additive model, except for SNPs with MAF<0.1 where we used the dominant model due to zero cells) including sex and age as covariates. In addition, to address the potential effects of population stratification, the first two principal components (PCs) delineated via Eigenstrat on 269 ancestry informative markers (AIMs) were included

in the model. For continuous data such as IL-10 levels, analyses were conducted using linear regression adjusted by sex, age and PCs.

Both analyses were performed considering adaptive permutations (EMP1). Permutation procedures provide a computationally intensive approach to generating significance levels empirically. Such values have desirable properties: for example, relaxing assumptions about normality of continuous phenotypes and Hardy-Weinberg equilibrium, dealing with rare alleles and small sample sizes, providing a framework for correction for multiple testing, and controlling for identified substructure or familial relationships by permuting only within cluster. In the case of adaptive permutations, we give up permuting SNPs that are clearly going to be non-significant more quickly than SNPs that look interesting (PURCELL et al, 2007).

All genetic analyses were performed using PLINK and the graph for IL-10 production among infected and non-infected subjects was constructed using STATA 8.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

RESULTS

The Table II summarizes the characteristics of the study population included sex, age and *H. pylori* infection. As can be seen in Table II, 55.40% of the children were male, the majority was between 6 and 7 years old (35.52%) and the presence of IgG anti-*H. pylori* was 28.04%. From now on in this study, the presence of IgG *H. pylori* antibody was considered a proxy's for infection.

Table II. Characteristics of the study population

	N (%)
Sex (n=1,343)	
Female	603 (44.60%)
Male	749 (55.40%)
Age (n=1,352)	
≤ 5y	472 (35.15%)
6-7 y	477 (35.52%)
≥ 8y	394 (29.34%)
IgG anti-<i>H. pylori</i> (n=1,259)	
Infected	353 (28.04%)
Non-infected	906 (71.96%)

The Figure I shows differences on IL-10 production between *H. pylori* infected and non-infected individuals *H. pylori*. The infected individuals showed a tendency to increased production of IL-10, however, this difference was not statistically significant.

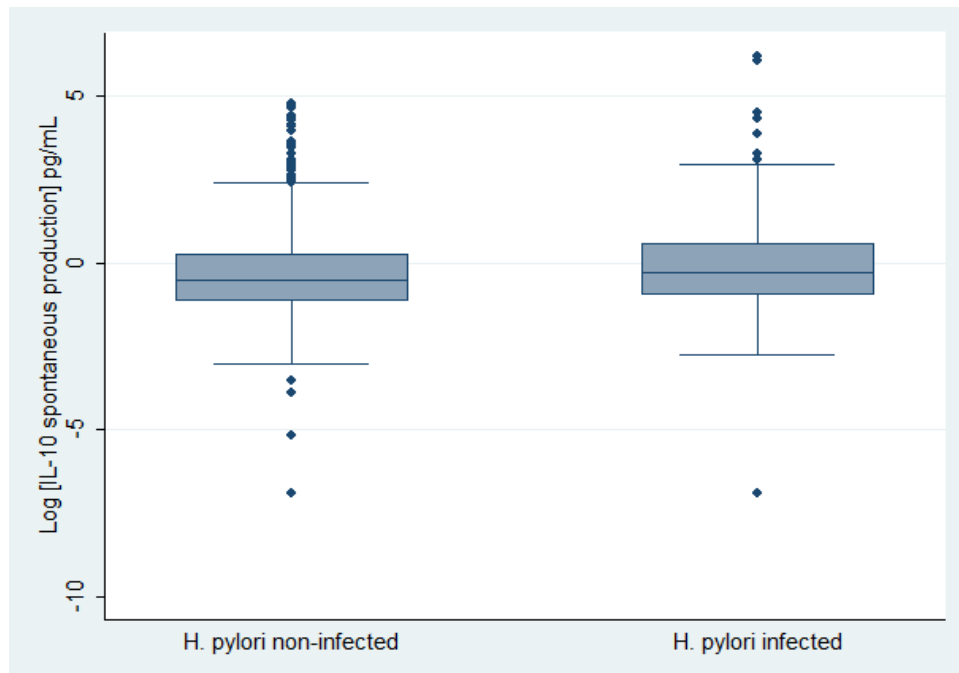


Figure I. Spontaneous IL-10 production among *H pylori* infected or non-infected subjects

The Table III shows associations between *IL10* SNPs and spontaneous IL-10 production. A total of 8 significant associations was found. Among them, we have observed a statistically significant negative associations for SNPs rs1518111 ($\beta = -0.077$; $p < 0.001$), rs1800872 ($\beta = -0.076$; $p < 0.001$), rs1800871 ($\beta = -0.071$; $p < 0.001$) and rs1554286 ($\beta = -0.066$; $p < 0.001$). Positive association was observed for SNPs rs3024496 ($\beta = 0.058$; $p = 0.003$), rs3024491 ($\beta = 0.050$, $p = 0.014$), rs1878672 ($\beta = 0.043$; $p = 0.036$), and rs1800896 ($\beta = 0.043$; $p = 0.036$). For the remaining SNPs were not observed statistically significant associations.

Table III. Associations between IL10 SNPs and spontaneous IL-10 production

SNP	β	p Value
rs1518111	-0.077	<0.001
rs1800872	-0.076	<0.001
rs1800871	-0.071	<0.001
rs1554286	-0.066	<0.001
rs3024496	0.058	0.003
rs3024491	0.050	0.014
rs1878672	0.043	0.036
rs1800896	0.040	0.042
rs3024498	-0.041	0.111
rs3024492	-0.059	0.136
rs3024495	-0.043	0.272
rs3024505	-0.017	0.629

The Table IV shows an association between *IL10* SNPs and infection by *H. pylori* (IgG anti-*H. pylori*). Positive associations was observed for the SNPs rs1800896 (OR = 1.249; 95% CI= 1.031 – 1.513; p = 0.023) and rs3024491 (OR = 1.233; 95% CI= 1.013 – 1.502; p = 0.036). The rs1878672 (OR = 1.217; 95% CI= 0.999 – 1.481; p = 0.050) was borderline associated with IgG anti-*H. pylori*, indicating a possible association of the SNP with the infection. For all the other SNPs, there were no statistically significant associations.

Table IV. Associations between *IL10* SNPs and *H. pylori* infection

SNP	OR	95%CI	pValue
rs1800896	1.249	1.031 – 1.513	0.023
rs3024491	1.233	1.013 – 1.502	0.036
rs1878672	1.217	0.999 – 1.481	0.050
rs3024496	1.177	0.978 – 1.417	0.084
rs3024495	1.274	0.894 – 1.815	0.178
rs3024492	1.221	0.845 – 1.763	0.285
rs3024505	1.141	0.798 – 1.630	0.467
rs1800872	0.934	0.778 – 1.123	0.469
rs1518111	0.936	0.778 – 1.127	0.487
rs1554286	0.962	0.798 – 1.160	0.685
rs1800871	0.975	0.812 – 1.172	0.791
rs3024498	0.980	0.763 – 1.259	0.878

DISCUSSION

Differences in IL-10 production were observed between *H. pylori* infected and non-infected individuals (Figure I). The group of infected individuals showed a tendency to increased production of IL-10, however, this difference was not statistically significant. This trend confirms the data found by De Vita et al (1999) in a study of cell cultures infected with *H. pylori* in which was demonstrated an increase in IL-10 production among infected individuals. Bodger et al (2001) also reported higher production of IL-10 in *H. pylori*-infected individuals than in non-infected subjects and those with *Helicobacter*-negative gastritis. Thus suggest that infected individuals have a tendency to increase production of IL-10.

Associations were also observed between *IL10* SNPs and spontaneous IL-10 production by linear regression analysis (Table III). The β value indicating negative associations were statistically significant ($p < 0.05$) for SNPs rs1518111, rs1800872, rs1800871 and rs1554286 which led us to believe that those variants are associated to decreased production of IL-10 spontaneously in subjects carrying the rare alleles. Chen *et al* (2012) also found that the IL-10 levels were significantly lower among subjects presenting the AA genotype for the polymorphism at position -592 (rs1800872) and having food allergy contrasting the data found by Suarez *et al* (2003).

A positive association was observed for SNPs rs3024496, rs3024491, rs1878672 and rs1800896 (Table III). These data show a combination of SNPs with increased production of IL-10 spontaneously. Polymorphisms in the IL-10 gene may alter the production of interleukin as well as their function and/or activity (SUAREZ, 2003). The SNP rs1800896 (-1082 A) showed significantly higher IL-10 protein production (TURNER, 1997) and for Suarez *et al* (2003) results also show that

normal subjects with allele G at position -1082 was the most important genetic factor in the regulation of constitutive IL-10 mRNA levels.

Analyzing the association between the *IL10* SNPs and infection by *H. pylori* (presence of IgG anti-*H. pylori*) positive association was observed for SNPs rs1800896, rs3024491 suggesting that the presence of these SNPs is associated with susceptibility to *H. pylori* infection. Our data showed that both SNPs are associated with increased production of IL-10 (Table III), thus, these findings suggest that elevated levels of cytokines might contribute to *H. pylori* infection. Previous studies demonstrated that elevated IL-10 levels could be associated with different kinds of infection by gram-positive and gram-negative bacterium (MARCHANT *et al.* 1994), fungals (VECCHIARELLI *et al.* 1996) and dengue infections (GREEN *et al.* 1999). The rs1878672 was borderline associated with infection by *H. pylori*, showing a possible tendency of this SNP to be associated with the infection.

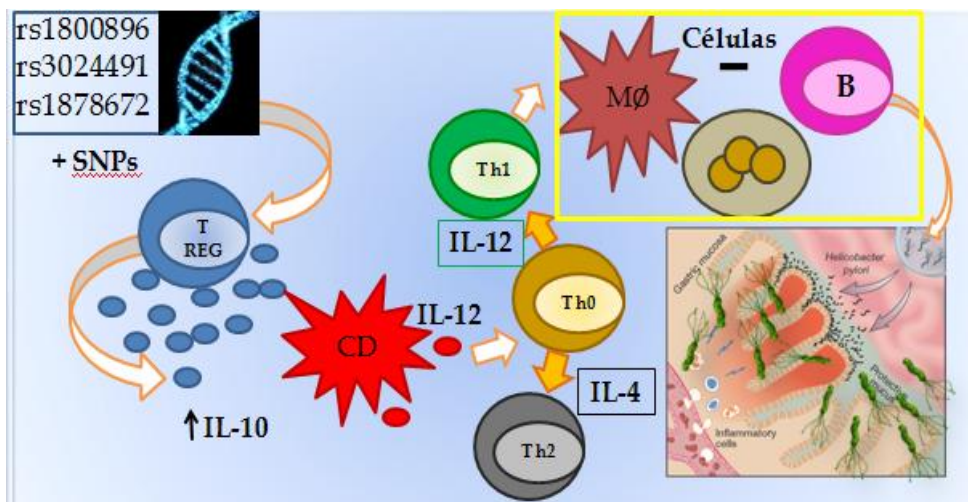


Figure II. Regulatory SNP and *H. pylori* infections

From our results, we suggest that variants rs1800896, rs3024491 and rs1878672 are more consistently associated with the presence of IgG anti-*H. pylori* by inducing increased production of IL-10. Further studies should be conducted to

further elucidate the role of other variants as well as investigate their impact on the occurrence of gastric cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

This study is funded by The Wellcome Trust, UK and the Brazilian agencies CAPES, CNPQ and FAPESB provided scholarships for the authors and supported this work.

REFERENCES

1. Kim, J. et al. Effects of Interleukin-10 Polymorphisms, *Helicobacter pylori* Infection, and Smoking on the Risk of Noncardia Gastric Cancer. *PLoS ONE*. 2012; 7(1).
2. Zeng, X. et al. Diverse *H. pylori* strains, IL-10 promoter polymorphisms with high morbidity of gastric cancer in Hexi area of Gansu Province, China. *Mol Cell Biochem*. 2012; 362: 241–248.
3. Monack, D.M.; Mueller, A.; Falkow, S. Persistent Bacterial Infections: The Interface of the Pathogen and the Host Immune System. *Nature Reviews| Microbiology*. 2004; 2:747.
4. Dattoli, V.C.C. et al. Seroprevalence and Potential Risk Factors for *Helicobacter pylori* Infection in Brazilian Children. *Helicobacter*. 2010;15: 273–278.
5. Hunt, R.H. et al. *Helicobacter pylori* nos países em desenvolvimento. *WGO Practice Guidelines*. 2010.
6. Turner, D. M. et al. An investigation of polymorphism in the Interleukin- 10 gene promoter. *European Journal of Immunogenetics* 1997;24:1-8.
7. Bergman, M. et al. *Helicobacter pylori* phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. *Nature Reviews | Microbiology*. 2006; 4.
8. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003; 75: 711–717.

9. Persson, C. et al. Polymorphisms in Inflammatory Response Genes and Their Association With Gastric Cancer: A HuGE Systematic Review and Meta-Analyses. *Am J Epidemiol*; 2011; 173:259–270.
10. El-Omar, E.M. et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003;124:1193–1201.
11. Figueiredo CA, Barreto ML, Rodrigues LC, Cooper PJ, Silva NB, Amorim LD, et al. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. *Infect Immun* 2010; 78:3160-7.
12. Figueiredo CA, Alcantara-Neves NM, Amorim LD, Silva NB, Carvalho LC, Cooper PJ, et al. Evidence for a modulatory effect of IL-10 on both Th1 and Th2 cytokine production: the role of the environment. *Clin Immunol* 2011;139:57-64.
13. Figueiredo C, Alcântara-Neves N, Veiga R, Amorim L, Dattoli V, Mendonça L, et al. Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. *Environ Health Perspect* 2009;117:845-9.
14. Barreto M, Genser B, Strina A, Teixeira M, Assis A, Rego R, et al. Impact of a citywide sanitation programme in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. *Environ Health Perspect* 2010;118:1637-42.
15. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14:143-9.

16. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-75.
17. De Vita F, et al. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer* 1999; 86(10):1936-43.
18. Bodger, K. et al. Interleukin 10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. *J Clin Pathol* 2001; 54: 285–292.
19. Chen, KT et al. Association between human IL-10 gene polymorphisms and serum IL-10 level in patients with food allergy. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2012; 111(12): 686–692.
20. Marchant A, Deviere J, Bylb, De Groote D, Vincent JL & Goldman M Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* 1994; 43(3):707–708.
21. Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Tascini C, Bistoni F & Kozel TR Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infect Immun* 1996; 64: 2866-2849;
22. Green, S. et al. Elevated Plasma Interleukin-10 Levels in Acute Dengue Correlate With Disease Severity. *Journal of Medical Virology*. 1999; 59: 329–334.

5 CONCLUSÃO GERAL

As variantes genéticas para *IL10* rs1518111, rs1800872, rs1800871 e rs1554286 foram negativamente associadas com a produção espontânea da citocina IL-10, e os SNPs rs3024496, rs3024491, rs1878672 e rs1800896 foram associados positivamente. Associações entre as variantes *IL10* e infecções por *H. pylori* foram observados para rs3024496, rs3024491, rs1878672 e rs1800896. Alguns dos SNPs que foram positivamente associados com a infecção por *H. pylori* também foram associados a produção espontânea de IL-10 em cultura ($p=0.04$ para rs1800896, $p=0.04$ para rs1878672 e $p=0.01$ para rs3024491). Através dos resultados obtidos, sugerimos que as variantes rs1800896, rs3024491 e rs1878672 por induzirem uma maior produção de IL-10 estão mais consistentemente associadas a presença de IgG anti-*H.pylori*. Novos trabalhos devem ser conduzidos no sentido de elucidar o papel das outras variantes bem como verificar o impacto destas na ocorrência de câncer gástrico.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, M. et al. Impact of a citywide sanitation programme in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environ Health Perspect** v. 118, p. 1637-42, 2010.
- BERGMAN, M. et al. Helicobacter pylori phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. **Nature Reviews | Microbiology**. v. 4, 2006.
- BLANCHARD, T.G. et al. Host response and vaccine development to Helicobacter pylori infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**; v. 241, p.181–213, 1999.
- BLASER, M.J. Helicobacter pylori: microbiology of a 'slow bacterial infection. **Trends Microbiol** v. 1, p. 255–260, 1993.
- BODGER, K. et al. Interleukin 10 in Helicobacter pylori associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. **J Clin Pathol**. v. 54, p. 285–292, 2001.
- BUNN, J.E.G. et al. Detection of Helicobacter pylori DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 450–454, 2002.
- COELHO, L.G.V. **II Consenso Nacional e Latino-Americano sobre Helicobacter pylori**. 2005
- CRABTREE, J.E. et al. Helicobacter pylori induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. **J. Clin. Pathol**; 48, 1995.
- CRABTREE, J.E. Immune and inflammatory responses to Helicobacter pylori infection. **Scand. J. Gastroenterol**. v..215, 1996.
- DATTOLI, V.C.C. et al. Seroprevalence and Potential Risk Factors for Helicobacter pylori Infection in Brazilian Children. **Helicobacter**. v.15, p. 273–278, 2010.
- DELAHAY, R.M.; RUGGE, M. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. **Helicobacter**. v. 17, n.1, p. 9–15, 2012.
- DE VITA F, et al. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. **Cancer** v. 86, n.10, p. 1936-43, 1999.
- EL-OMAR, E.M. et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. **Gastroenterology**. v.124, p. 1193–1201, 2003.
- FIGUEIREDO C, Alcântara-Neves N, Veiga R, Amorim L, Dattoli V, Mendonça L, et al. Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. **Environ Health Perspect**; v.117, p. 845-9, 2009.
- FIGUEIREDO C, et al. Spontaneous cytokine production in children according to biological characteristics and environmental exposures. **Environ Health Perspect** v. 117, p. 845-9, 2009.

FIGUEIREDO CA, Alcantara-Neves NM, Amorim LD, Silva NB, Carvalho LC, Cooper PJ, et al. Evidence for a modulatory effect of IL-10 on both Th1 and Th2 cytokine production: the role of the environment. **Clin Immunol** v. 139, p. 57-64, 2011.

FIGUEIREDO CA, et al. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. **Infect Immun**; v.78, p. 3160-7, 2010.

GREEN, S. et al. Elevated Plasma Interleukin-10 Levels in Acute Dengue Correlate With Disease Severity. **Journal of Medical Virology**. v. 59, p. 329–334, 1999.

HOWELL, W. M.; ZERILLI, M. J. R. Cytokine Gene Polymorphisms, Cancer Susceptibility, and Prognosis. **The Journal of Nutrition**. v.137, p. 194S–199S, 2007.

HUNT, R.H. et al . Helicobacter pylori nos países em desenvolvimento. **WGO Practice Guidelines**. 2010.

KHAN, A.; FAROOQUI, A.; KAZMI, S. U. Presence of Helicobacter pylori in drinking water of Karachi, Pakistan. **J Infect Dev Ctries**. v. 6, n. 3, p.251-255, 2012.

KIM, J. et al. Effects of Interleukin-10 Polymorphisms, Helicobacter pylori Infection, and Smoking on the Risk of Noncardia Gastric Cancer. **PLoS ONE**. v. 7, n. 1, 2011

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKI, T. Gastric Cancer and *Helicobacter pylori* infection. **Journal of physiology and pharmacology**. v. 57, n. 3, p. 51-65, 2006.

LEE, A.; FOX, J.; HAZELL, S. Pathogenicity of Helicobacter pylori: a Perspective. **Infection and immunity**. v. 61, n. 5, p. 1601-1610, 1993.

LIU, H.; MORA, C.S.; DUBOIS, A. Mechanism of H.pylori intracellular entry: an in vitro study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 2, 2012.

LIVAK KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. **Genet Anal** v.14, p. 143-9, 1999.

MARSHALL, B.J. et al. Urea Protects Helicobacter (Campylobacter) pylori from the bactericidal effect of Acid. **Gastroenterology**. v. 99, p. 697-702, 1990.

McNAMARA, A.; EL-OMAR, E. Helicobacter pylori infection and the pathogenesis of gastric cancer: A paradigm for host–bacterial interactions. **Digestive and Liver Disease**. v. 40, p. 504–509, 2008.

MEYER, F. et al. Modulation of innate cytokine responses by products of Helicobacter pylori. **Infect. Immun**; v.68, p. 6265–6272, 2000.

MOCELLIN S, Marincola FM, Young HA: Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **J Leukoc Biol**. v. 78, n.5, p.1043-1051, 2005.

MONACK, D.M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. Persistent Bacterial Infections: The Interface of the Pathogen and the Host Immune System. **Nature Reviews| Microbiology**. v. 2, p. 747, 2004.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 Receptor. **Annu. Rev. Immunol**.v.19, p. 683–765, 2001.

- MURPHY, G. et al . Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory related genes IL-1B, IL-1RN, IL-10, TNF and TLR4. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** v. 21, n. 6, p. 630–635, 2009.
- PEEK, J.R. et al. Role of Innate Immunity in Helicobacter pylori-Induced Gastric Malignancy. **Physiol Rev.** v. 90, 2010.
- PERSSON, C. et al. Polymorphisms in Inflammatory Response Genes and Their Association With Gastric Cancer: A HuGE Systematic Review and Meta-Analyses. **Am J Epidemiol**; v.173, p. 259–270, 2011.
- PRINZ, C.; HAFSI, N.; VOLAND, P. Helicobacter pylori virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. **TRENDS in Microbiology.** v.11, n. 3, 2003.
- PURCELL S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **Am J Hum Genet** v. 81, p. 559-75, 2007.
- RAMARAO, N. and Meyer, T.F. Helicobacter pylori resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. **Infect. Immun.**v. 69, p. 2604–2611, 2001.
- RODRIGUES LC, Newcombe PJ, Cunha SS, Alcantara-Neves NM, Genser B, Cruz AA, et al. Early infection with Trichuris trichiura and allergen skin test reactivity in later childhood. **Clin Exp Allergy** v. 38, p.1769-77, 2008.
- ROMAGNANI, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. **Int J Clin Lab Res.** v.21, p. 152-158, 1991.
- SERRANO, C.A. et al. Relationship between Helicobacter pylori virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. **Microbes and Infection.** v.9, p. 428-434, 2007.
- SUGIMOTO, M. et al. Effects of interleukin-10 gene polymorphism on the development of gastric cancer and peptic ulcer in Japanese subjects. **Journal of Gastroenterology and Hepatology.** v. 22, p. 1443–1449, 2007.
- SUTTON, P. et al. A. Dominant Nonresponsiveness to *Helicobacter pylori* Infection is associated with production of Interleukin 10 but not gamma interferon. **Infection and Immunity.** v. 68, n. 8, p. 4802–4804, 2000.
- TURNER, D. M. et al. An investigation of polymorphism in the Interleukin- 10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics** .v. 24, p.1-8, 1997.
- VAIRA D, et al. Routes of transmission of Helicobacter pylori infection., **Ital J Gastroenterol Hepatol.** v. 30, n. 3, p. 279-85,1998.
- WIESE, M. et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* and *Helicobacter pylori* Caga+ on the expression of selected superficial molecules on monocyte and lymphocyte and the synthesis of cytokines in whole blood culture. **Journal of Physiology and Pharmacology.**, v. 63, n. 3, p. 217-224, 2012.
- WON, H.H. et al. Interleukin 10 polymorphisms differentially influence the risk of gastric cancer in East Asians and Caucasians. **Cytokine.** v. 51, p. 73–77, 2010.

XUE, H. et al. Interleukin-10-819 promoter polymorphism in association with gastric cancer risk. **BMC Cancer**. v. 12, p. 102, 2012.

ZENG, X. et al. Diverse H. pylori strains, IL-10 promoter polymorphisms with high morbidity of gastric cancer in Hexi area of Gansu Province, China. **Mol Cell Biochem**. v. 362, p. 241–248, 2012.

ANEXO – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA