

---



---

**Artigo Original / Original Article**


---

## O POLIMORFISMO IFNGR1-56C/T (CADEIA 1 DO RECEPTOR DO INTERFERÃO GAMA) ESTÁ ASSOCIADO COM O RISCO AUMENTADO DE CARCINOMA GÁSTRICO EM IDADE PRECOCE\*

P. CANEDO<sup>1,2</sup>, J. SILVA RAMOS<sup>3</sup>, M. J. BETTENCOURT<sup>3</sup>, A. DAVID MARQUES<sup>3</sup>, M. MENDES<sup>3</sup>, F. PEREIRA<sup>1</sup>, R. MACEDO<sup>3</sup>, S. OLIVEIRA MARTINS<sup>3</sup>, C. PINTO<sup>3</sup>, J. GUEDES DA SILVA<sup>3</sup>, M. J. PINHEIRO<sup>3</sup>, J. PENEDO<sup>3</sup>, L. MONIZ<sup>3</sup>, F. CARNEIRO<sup>1,2</sup>, J. C. MACHADO<sup>1,2</sup>

### Resumo

Já foi amplamente demonstrada a existência de uma associação entre polimorfismos genéticos existentes em genes relacionados com a inflamação e o risco de carcinoma gástrico (CG). Temos como exemplos os polimorfismos presentes no gene do factor de necrose tumoral (alelo TNFA-308A), interleucina-1 beta (alelos IL1B-31C e IL1B-511T) e no antagonista do receptor da interleucina-1. Com vista a verificar a existência de uma associação entre a presença do polimorfismo -56C/T do gene que codifica a cadeia 1 do receptor do interferão gama (IFNGR1) e o desenvolvimento de CG, foi efectuado um estudo caso-controlo com 284 controlos e 182 casos. Foram ainda construídos vectores de luciferase com cada um dos alelos, o que permitiu avaliar o efeito de cada um no nível de transcrição do gene. Os nossos resultados demonstram que o alelo IFNGR1\*T está significativamente associado com o risco de desenvolvimento de CG em indivíduos com idades inferiores a 45 anos. Neste subconjunto de casos verificámos que indivíduos portadores do genótipo IFNGR1\*C/\*T ou IFNGR1\*T/\*T têm um risco aumentado para o desenvolvimento de CG com um *odds ratio* de 2,8 (95%CI, 1,02-7,58), e de 4,1 (95%CI, 1,51-11,27), respectivamente. Demonstrámos ainda que o alelo IFNGR1\*T induz um nível de transcrição 10 vezes superior ao alelo IFNGR1\*C. O alelo -56\*T está associado significativamente com uma expressão aumentada do gene IFNGR1 e, consequentemente, pode ter um papel relevante na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro aquando da infecção pelo *Helicobacter pylori*.

### Summary

It has been demonstrated that human genetic polymorphisms in some inflammation-related genes are associated with risk of gastric cancer (GC). Examples include polymorphisms in tumor necrosis factor (TNFA-308A allele), interleukin-1 beta (IL1B-31C and IL1B-511T alleles) and Interleukin-1 receptor antagonist genes (IL1RN\*2 allele). In a case-control study including 284 controls and 182 GC patients, we have analyzed the association between -56C/T polymorphism in chain 1 of the interferon gamma receptor I (IFNGR1) gene and risk of developing GC. In order to evaluate the putative effect of -56C/T promoter polymorphism in the level of expression of the IFNGR1 gene, IFNGR1-56C/T allele specific luciferase reporter constructs were used. Our results show that the IFNGR1\*T allele is significantly associated with increased risk of GC in individuals up to 45 years of age. In this subset of cases we found that individuals carrying the IFNGR1\*C/\*T or the IFNGR1\*T/\*T genotypes have an increased risk of GC with an OR of 2.8 (95% CI, 1.02-7.58) and of 4.1 (95% CI, 1.51-11.27), respectively. We have also demonstrated that the IFNGR1\*T allele induces a 10-fold overexpression in a luciferase reporter assay. Our results indicate that IFNGR1-56C/T polymorphism is yet another relevant host susceptibility factor for GC development. The -56\*T allele is associated with significantly increased expression of the IFNGR1 gene and may therefore play an important role in modulating the host inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection.

GE - J Port Gastrenterol 2005, 12: 296-300

### Abreviaturas Utilizadas:

CG - Carcinoma gástrico

OR - Odds Ratio

IFNGR1 - Cadeia 1 do receptor do interferão gama

### INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico (CG) é uma das neoplasias mais comuns, sendo responsável pela morte de mais de

600.000 pessoas por ano a nível mundial (1). Em Portugal a incidência deste tipo de cancro é de aproximadamente 36 pessoas em cada 100.000 habitantes, o que corresponde a uma das mais altas taxas de incidência registadas no Mundo.

Um dos factores etiológicos primários associados com o desenvolvimento de CG é a infecção por *Helicobacter*

(1) IPATIMUP - Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(2) Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(3) Hospital dos Capuchos, Lisboa, Portugal.

\* Trabalho distinguido com o Prémio Nacional de Gastrenterologia 2005.

*pylori*, uma bactéria capaz de colonizar a mucosa gástrica humana (2,3). Esta infecção induz inicialmente uma gastrite crónica superficial não atrofica que, em alguns casos, pode progredir para gastrite crónica atrofica, metaplasia intestinal, displasia e finalmente CG (4,5). A taxa de infecção a nível mundial varia desde os 30% que se encontra no norte da Europa até aos 90% existentes em alguns países Asiáticos e Sul-Americanos. Em Portugal a taxa de infecção em adultos é de cerca de 80% (6).

No entanto, existe uma enorme diferença entre o número de pessoas infectadas por *H. pylori* e o número de pessoas que desenvolve CG. Este facto leva-nos a considerar que a progressão para CG depende não só da patogenicidade da bactéria *H. pylori*, mas também da susceptibilidade do hospedeiro. Em concordância com esta hipótese tem sido demonstrado que polimorfismos existentes em genes envolvidos na regulação da resposta inflamatória, tais como os presentes nos genes da interleucina-1 (IL-1B) do antagonista do receptor da interleucina-1 (IL1RN) (7-9) e do factor de necrose tumoral alfa (TNFA) (10), aumentam o risco de desenvolvimento de CG.

Recentemente um estudo de análise de *linkage* envolvendo todo o genoma humano levou à identificação de uma associação entre um polimorfismo situado no promotor do gene da cadeia 1 do receptor do interferão gama (IFNGR1-56C/T) e risco de infecção por *H. pylori* (11). O presente estudo tem como objectivo verificar se existe alguma associação entre a presença deste polimorfismo e risco de desenvolvimento de CG. Com vista a atingir este objectivo foi feito um estudo caso-controlo, seguido de um estudo funcional *in vitro* deste polimorfismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População de Estudo

Um total de 466 indivíduos de nacionalidade Portuguesa foram analisados neste estudo, sendo que destes, 284 eram indivíduos controlo e 182 eram indivíduos com CG. O grupo controlo é constituído por dadores de sangue (idades compreendidas entre os 18 e os 64 anos; média das idades 37 anos; mediana das idades 35 anos). Os pacientes com CG foram diagnosticados e tratados no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), no Hospital de S. João do Porto e no Hospital dos Capuchos de Lisboa (idades compreendidas entre os 26 e os 90 anos; média das idades 56 anos; mediana das idades 58 anos). O ADN dos indivíduos do grupo controlo foi isolado a partir de sangue periférico. O ADN dos pacientes com CG

foi isolado a partir de biopsias congeladas quer da mucosa neoplásica quer da mucosa não neoplásica. Os procedimentos efectuados neste estudo estavam de acordo com os padrões éticos institucionais. O estudo realizado foi anonimizado sendo que nenhuma das amostras estudadas continha dados pessoais relativamente aos indivíduos analisados.

### Histopatologia

As amostras tecidulares dos carcinomas gástricos foram fixadas em formalina, embebidas em parafina e coradas com H&E, *alcian blue-periodic acid Schiff*, e Giemsa modificado. Os carcinomas gástricos foram ainda classificados de acordo com a classificação de Laurén em intestinais (n=75), difusos (n=69) e atípicos (n=38). Quanto à localização dos tumores 26 estavam presentes no cardia (14,2%) e 156 em zonas não-cardia (85,8%).

### Genotipagem do Polimorfismo IFNGR1-56C/T

O ADN genómico de amostras de sangue de indivíduos controlo e de mucosa gástrica não neoplásica de indivíduos com CG, foi isolado através de digestão com proteínase K e extração por NaCl/clorofórmio/isopropanol (12)

A genotipagem deste polimorfismo foi efectuada por *Taqman*<sup>®</sup> utilizando o sistema *ABI Sequence Detection System 7000* e o *assay-on-demand C\_11693991\_10* com o seguinte protocolo: 95°C durante 10 minutos com uma desnaturação inicial e 40 ciclos a 95°C durante 10 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Num subconjunto de casos (n = 10) e de controlos (n = 15) as genotipagens foram verificadas por sequenciação usando as condições descritas por *Thye et al* (11).

### Análise Estatística

A avaliação da existência de desvios relativamente ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feita através de testes exactos com o programa *GENEPOP* (disponível em: <ftp://ftp.cefe.cnrsmop.fr/pub/pc/msdos/genepop/>). A comparação das frequências genotípicas entre casos e controlos foi efectuada através do teste de  $\chi^2$ . Os *odds ratios* (OR) não ajustados e ajustados para idade e sexo foram calculados por meio de uma análise de regressão logística. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de  $P < 0,05$ .

### Luciferase Reporter Assay

Para verificar a relevância funcional do polimorfismo IFNGR1-56C/T, a zona do promotor do gene (750 pb)

foi clonada num vector de expressão numa posição 5' relativamente ao gene da luciferase. Foram construídos dois vectores que diferiam apenas na posição -56 do promotor, que posteriormente foram transfectados em duas linhas celulares derivadas de cancro da mama (MDA-MB-231 e MDA-MB-435) e duas linhas derivadas de CG (AGS e GP202).

## RESULTADOS

As frequências genotípicas do polimorfismo estudado não se desviavam significativamente do esperado numa população que se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas encontradas em casos e controlos, assim como os OR associados, estão sumariados no Quadro 1. Quando analisados os casos de uma maneira global não se encontram quaisquer diferenças significativas entre casos e controlos. Contudo quando se dividem os casos em dois grupos baseados na idade (indivíduos com idade menor ou igual a 45 anos e indivíduos com mais de 45 anos) verificamos que no grupo dos indivíduos jovens o alelo T do polimorfismo IFNGR1-56 está significativamente associado com o desenvolvimento de CG (Quadro 2). Vemos então que os indivíduos possuidores do genótipo CT apresentam um risco aumentado com um OR de 2,8 (1, 10-7,30), e que os indivíduos que possuem o genótipo TT apresentam um risco aumentado com um OR de 4,1 (1,60-10,30), enquanto que nos indivíduos mais velhos não se identificam quaisquer associações significativas. Não foram detectadas quaisquer diferenças significativas entre casos e controlos após estratificação por sexo, tipo histológico e local anatómico dos tumores.

Para verificar a relevância funcional do polimorfismo estudado, a zona do promotor do gene (750 pb) foi clonada num vector de expressão que passa a exprimir o gene da luciferase sob a acção do promotor em estudo. Foram então construídos dois vectores que variavam apenas no nucleótido -56 da sequência do promotor, que posteriormente foram transfectados em duas linhas celulares de cancro da mama e duas linhas celulares de CG. A quantificação da luciferase após transfecção permitiu-nos concluir que o alelo IFNGR1\*T leva a um aumento da expressão variável de 3 a 10 vezes (Figura 1).

**Quadro 1 - Frequências genotípicas observadas em controlos e casos analisados.**

Genótipos	Controlos (%)	Casos (%)	OR (95%CI)
IFNGR1-56 CC	68 (24,0)	39 (21,4)	1
IFNGR1-56 TC	127 (44,7)	73 (40,1)	1 (0,6-1,6)
IFNGR1-56 TT	89 (31,3)	70 (38,5)	1,4 (0,8-2,3)

OR = Odds Ratio; ns = não significativo.

## DISCUSSÃO

A infecção por *H. pylori*, uma bactéria que coloniza o estômago humano, resulta em gastrite crónica superficial. Esta pode evoluir para gastrite crónica atrofica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, CG. No entanto, a progressão para CG ocorre apenas numa pequena proporção dos indivíduos infectados, e parece depender de factores da bactéria e do hospedeiro. Entre os factores do hospedeiro têm assumido particular relevância os factores genéticos ligados ao controlo da resposta inflamatória.

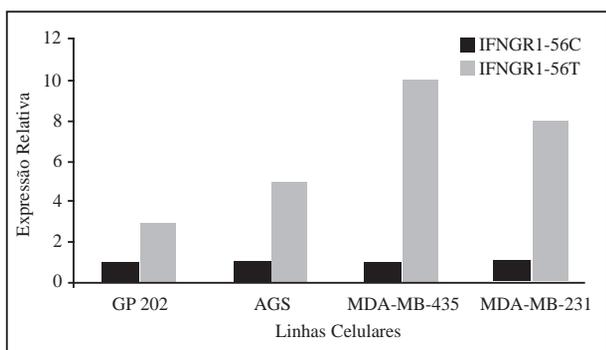
Estudos clínicos demonstraram que o *H. pylori* induz uma resposta inflamatória na mucosa gástrica humana do tipo Th1 (13). Sabe-se também que o interferão gama (IFN- $\gamma$ ) e o seu receptor são elementos chave neste tipo de resposta inflamatória. Estudos no modelo murino de *H. felis* revelaram que o IFN- $\gamma$  está envolvido na patogénese da gastrite assim como na imunoprotecção (14,15). O trabalho de Smythies e colegas (16) demonstrou que ratos que não exprimem IFN- $\gamma$  aquando da infecção por *H. felis* não desenvolvem uma inflamação gástrica. Os vários estudos atrás referidos demonstram a importância do IFN- $\gamma$  na resposta inflamatória à infecção por *H. pylori*.

Neste estudo verificamos que a presença do alelo IFNGR1\*T leva a um risco aumentado de desenvolvimento de CG numa idade precoce (< 46 anos). Para indivíduos portadores do genótipo C/T observámos um risco com um OR de 2,8 e para indivíduos homocigóticos T/T um risco com um OR de 4,1. Esta é a primeira demonstração de uma associação entre risco de CG e polimorfismos no gene IFNGR1. Este resultado confere também um significado mais abrangente ao trabalho publicado por Thye *et al* (11), onde foi demonstrada uma associação entre o alelo IFNGR1\*T e risco de infecção por *H.*

**Quadro 2 - Frequências genotípicas observadas em controlos, casos com idade inferior ou igual a 45 anos e casos com idade superior a 45 anos**

Genótipos	Controlos (%)	Casos $\leq$ 45 anos (%)	OR (95% CI)	Casos $\geq$ 45 anos (%)	OR (95% CI)
IFNGR1-56 CC	68 (24,0)	5 (8,6%)	1	34 (17,6%)	1
IFNGR1-56 TC	127 (44,7)	26 (44,8%)	2,8 (1,11-7,30)	46 (37,4%)	0,7 (0,40-1,20)
IFNGR1-56 TT	89 (31,3)	27 (46,6%)	4,1 (1,60-10,90)	43 (35,0%)	1,0 (0,60-1,70)

OR = Odds Ratio; ns = não significativo.



**Figura 1 - Luciferase Reporter Assay para os alelos IFNGR1-56C e IFNGR1-56T.**

*pylori*, já que confirma que factores que "facilitam" a infecção por *H. pylori* também aumentam o risco de desenvolvimentos de CG.

Para além da associação estatisticamente significativa com risco de CG, demonstrámos que o polimorfismo IFNGR1C/T é funcionalmente relevante. De acordo com o *luciferase reporter assay* que realizámos, a transição C para T na posição -56 do gene IFNGR1 dá origem a um promotor génico com maior capacidade de indução da transcrição de ARN. Este resultado permite especular que um aumento do número de receptores do IFN- $\gamma$  leva a um aumento da acção do próprio IFN- $\gamma$ . Este aumento da acção do IFN- $\gamma$  levaria a uma resposta inflamatória crónica aumentada que, por sua vez, pode resultar num aumento de risco de progressão para CG.

Os resultados apresentados neste estudo vêm na linha de resultados já publicados por nós para a população Portuguesa (8,9,17) e por outros autores noutras populações (7,18-22) a demonstrar que polimorfismos pró-inflamatórios (alelos IL1B-511\*T, IL1RN\*2 e TNFA-308\*A) conferem um risco aumentado de CG. Todos estes trabalhos inserem-se numa lógica de identificação de factores genéticos de risco que tem como fim último a determinação de um perfil genético de susceptibilidade para desenvolvimento de CG. A possibilidade de determinação de riscos individuais de desenvolvimento de CG pode constituir uma ferramenta importante para a prevenção desta doença. Isto assume uma particular importância em países com uma taxa de infecção de *H. pylori* elevada (como Portugal), uma vez que permitiria direccionar intervenções com objectivos preventivos para indivíduos com risco aumentado de desenvolvimento de CG.

**Agradecimentos:**

Este estudo foi co-financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (POCTI/CBO/41550/2001 e

REEQ/218/SAU/2005), pelo Programa Operacional Ciência, Tecnologia e Inovação (POCTI), pelo Fundo Comunitário Europeu (FEDER), pelo Programa Operacional de Saúde / SAÚDE XXI e pela Associação Portuguesa da Industria Farmacêutica (APIFARMA).

**Correspondência:**

José Carlos Machado  
 Rua Roberto Frias S/N  
 4200-465 Porto, Portugal  
 Telef.: +351 225 570 700  
 Fax: +351 225 570 799  
 e-mail: josem@ipatimup.pt

**BIBLIOGRAFIA**

1. Parkin DM. The global burden of cancer. *Semin Cancer Biol* 1998; 8: 219-235.
2. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127- 31.
3. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784- 89.
4. Correa P. A Human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48:3554-60.
5. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-740.
6. Esteves J, Fidalgo P, Tendeiro T, Chagas C, Ferra A, Leitao CN, Mira FC. Anti-*Helicobacter pylori* antibodies prevalence and gastric adenocarcinoma in Portugal: report of a case-control study. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2: 377- 80.
7. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer (published erratum appears in *Nature* 2001;412:99). *Nature* 2000; 404: 398-402.
8. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, et al. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121: 823-29.
9. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, et al. A pro-inflammatory genetic profile increases the risk of chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 364-71.
10. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48: 743-47.
11. Thye T, Burchard GD, Nilius M, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting *Helicobacter pylori* infection. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 448-53.
12. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim Van Dillen PME, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
13. D'Elisio MM, Manghetti M, De CM, Costa F, Baldari CT, Burroni

- D, Telford JL, Romagnani S, Del PG. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol* 1997; 158:962-967.
14. Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, et al. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect Immun* 1999; 67: 279-285.
  15. Kamradt AE, Greiner M, Ghiara P, Kaufmann SH. *Helicobacter pylori* infection in wild-type and cytokine-deficient C57BL/6 and BALB/c mouse mutants. *Microbes Infect* 2000; 2: 593-97.
  16. Smythies LE, Waites KB, Lindsey JR, Harris PR, Ghiara P, Smith PD. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165:1022-29.
  17. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-1 genotyping: An opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1680-87.
  18. Chang YW, Jang JY, Kim NH, Lee JW, Lee HJ, Jung WW, et al. Interleukin-1B (IL-1B) polymorphisms and gastric mucosal levels of IL-1beta cytokine in Korean patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 2005; 114: 465-71.
  19. El Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003; 124: 1193-1201.
  20. Lee KA, Ki CS, Kim HJ, Sohn KM, Kim JW, Kang WK, et al. Novel interleukin 1beta polymorphism increased the risk of gastric cancer in a Korean population. *J Gastroenterol* 2004; 39: 429-33.
  21. Wu MS, Wu CY, Chen CJ, Lin MT, Shun CT, Lin JT. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int J Cancer* 2003; 104: 617-23.
  22. Yang J, Hu Z, Xu Y, Shen J, Niu J, Hu X, Guo J, et al. Interleukin-1B gene promoter variants are associated with an increased risk of gastric cancer in a Chinese population. *Cancer Lett* 2004; 215: 191-98.