

ARTIGO ORIGINAL

***Polimorfismo da Interleucina-8 -251T>A e Helicobacter pylori.
Interleukin-8 -251T>A polymorphism and Helicobacter pylori.*****Rita de Cássia Fabris¹, Lucas Trevizani Rasmussen², Agostinho Caleman Neto³, Roger Willian de Lábio³,
Wilson Orcini¹, João Paulo Bianchi Ximenez¹, Solange Franzolin¹, Spencer Luiz Marques Payão¹****Resumo**

Introdução: o *Helicobacter pylori* é um importante patógeno associado ao desenvolvimento de gastrite crônica, úlcera péptica e doenças gástricas. Vários autores relataram que a infiltração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, é um traço da patologia da mucosa gástrica associada com a infecção. Há evidências de que a inflamação está associada à gravidade das lesões gástricas. A interleucina 8 (IL-8), um membro da família das citocinas, é um ativador quimiotático de neutrófilos e linfócitos e tem sido descrito que o aumento dos níveis de IL-8 na mucosa gástrica pode estar associado com a infecção por *H.pylori*. **Objetivos:** os objetivos deste trabalho foram (i) caracterizar o polimorfismo da Interleucina-8 -251T>A (ii) e verificar a possível relação entre este polimorfismo e infecção por *H.pylori*. **Métodos:** cento e sessenta pacientes sintomáticos (com idade média de 48,7 anos) participaram do estudo: 107 pacientes positivos para *H.pylori* e 53 negativos, previamente diagnosticados por PCR. Os genótipos da IL-8 -251 T>A foram determinados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e utilização de enzimas de restrição (RFLP). **Resultados e Conclusões:** nossos resultados indicam que não há associação entre o polimorfismo da IL-8 -251 T>A e a infecção por *H.pylori* ou pelo gênero dos pacientes.

Descritores:1-Interleucina 8;
2-*Helicobacter pylori*;
3-doença gástrica.**Abstract**

Background: *Helicobacter pylori* is an important pathogen associated with the development of chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric disease. Several authors reported that the infiltration of inflammatory cells, including neutrophils is the trace of the pathology of gastric mucosa, associated with the infection. There is high evidence that inflammation is associated with severity of gastric lesions. Interleukin-8 (IL-8), a member of cytokines family, is an activator and chemoattractant of neutrophils and lymphocytes. It has been reported that increased gastric mucosal levels of IL-8 is associated with *H. pylori* infection. **Objective:** the objectives of this paper were (i) characterize Interleukin-8 -251T>A polymorphism and (ii) to examine the possible relationship between this polymorphism and the *H. pylori* infection. **Methods:** one hundred and sixty patients, (with a mean age 48.7 years) presenting recurrent abdominal pain participated in the study: 107 *H. pylori* positives and 53 *H. pylori* negatives previously diagnosed by PCR. IL8 -251T>A genotypes were determined using a polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Results and Conclusions:** our findings indicate that there is no association of IL-8 -251T>A with *H. pylori*-infected patients or gender of these patients and these conclusions were consistent with other reports from different population samples.

Keywords:1-Interleukin 8;
2-*Helicobacter pylori*;
3-gastric diseases.

1. Msc. Programa de Pós-graduação em Biologia Oral, USC Universidade do Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, Brasil
2. Msc. Disciplina Genética, Hemocentro, Faculdade de Medicina de Marília, Marília, São Paulo, Brasil. Departamento de Morfologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.
3. Disciplina Genética, Hemocentro. Faculdade de Medicina de Marília, Marília, São Paulo, Brasil.

Introdução

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram negativa, espiralada, que coloniza a mucosa gástrica dos humanos e exerce um papel fundamental no desenvolvimento de muitas doenças gastroduodenais, particularmente na gastrite crônica, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma de MALT (mucosa associated lymphoid tissue). A infecção pelo *H. pylori* é uma das mais prevalentes entre os seres humanos, estima-se que metade da população mundial esteja infectada pela bactéria^(1,2). A aquisição da infecção ocorre principalmente durante a infância e pode ser associada a condições sociais, econômicas e de higiene pessoal⁽³⁾.

A prevalência da infecção por *H. pylori* nos países em desenvolvimento é muito elevada quando comparada com países desenvolvidos, podendo atingir 50% das crianças já aos cinco anos de idade^(4,5). No Brasil, os índices podem chegar a 80% em adultos, enquanto na América do Norte e Europa eles variam entre 30% e 70%⁽⁴⁻⁹⁾.

Retrospectivos e prospectivos estudos mostram uma importante relação entre a infecção pelo *H. pylori* e o risco para o câncer gástrico distal^(10,11). Embora altas taxas de infecção estejam associadas ao *H. pylori*, os mecanismos de aquisição e transmissão permanecem incertos, entretanto as vias: fecal-oral, oral-oral, e gastro-oral parecem ser as principais formas de aquisição e transmissão⁽¹²⁾.

A infecção pelo *H. pylori* resulta na inflamação crônica da mucosa gástrica, que induz, além da formação de um infiltrado inflamatório de neutrófilos e monócitos a expressão de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas^(1,2,6,8), fator de necrose tumoral (alfa) e interferon⁽¹³⁾. Siqueira et al.⁽¹⁴⁾, descrevem o envolvimento de algumas cepas de *H. pylori* na produção da Interleucina 8 (IL-8) sendo portanto, de importância no grau de inflamação e no espectro da doença, assim a intensidade e a forma das respostas inflamatória, associadas à virulência da cepa, possam estar ligadas no desenvolvimento das doenças gástricas.

Estudos anteriores sugerem que o polimorfismo -251 na região promotora do gene da IL-8 possa estar associado ao aumento no risco de câncer gástrico e úlcera gástrica em pacientes infectados pelo *H. pylori*⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Correa et al.⁽¹⁸⁾, demonstraram que pacientes portadores do alelo A na posição -251 do gene da IL-8 apresentam uma maior atividade transcricional quando comparados com pacientes portadores do alelo T. Além disso o alelo A pode induzir um potencial sítio de ligação induzindo o aumento dos níveis de IL-8 por outras vias^(19,20).

Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a associação entre o polimorfismo da IL-8 -251 T>A e a infecção pelo *H. pylori* em pacientes brasileiros sintomáticos.

Material e métodos

Pacientes e coleta de material

Cento e sessenta pacientes adultos (81 ♂/79 ♀ com idade média de 48.7 anos) sintomáticos participaram deste estudo. Todos os pacientes foram atendidos pelo Ambulatório de Endoscopia de Faculdade de Medicina de Marília, São Paulo, Brasil. Todos os pacientes concordaram em participar deste estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Sagrado Coração de Bauru – USC (Nº de protocolo 058/2005).

Foram coletadas três biópsias de antro gástrico de cada paciente. A primeira biópsia coletada foi utilizada para a realização do teste rápido da urease, o segundo fragmento foi encaminhado para a análise histopatológica e o terceiro encaminhado para a análise molecular. A infecção foi determinada pelo teste rápido da urease, utilizando o kit TUPF (Laborclin, Brasil), de acordo com instruções do fabricante, pela análise histopatológica, realizada de acordo com o sistema Sydney (dados não apresentados) e pela análise molecular.

Extração de DNA e diagnóstico do *H. pylori* pela PCR

O DNA das amostras de biópsia gástrica foi extraído utilizando o kit comercial QIAamp tissue (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante. A PCR foi realizada com aproximadamente 100ng do DNA total, utilizando um par de nucleotídeos Hpx1 - 5'-CTGGAGARACTAAGYCCCTCC-3' e Hpx2 - 5'-GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA-3' os quais amplificam um fragmento de 150pb correspondente ao gene 16S-rRNA do *H. pylori*⁽²²⁾. As condições da PCR são: desnaturação inicial de 94°C/5 min seguido de 40 ciclos de: 94°C/45 seg., 59°C/45 seg., 72°C/45 seg. e 72°C/7 min de extensão final. Em cada experimento, foram incluídos controles positivos (cepa 26695) e negativos (água). O exame foi considerado positivo quando o produto da PCR estava presente.

Genotipagem da Interleucina – 8 (-251T>A)

O genótipo de IL-8 -251T>A foi determinado através da PCR-RFLP. Um fragmento de 349pb foi amplificado do DNA genômico, utilizado os oligonucleotídeos: F1- 5'-CAT GAT AGC ATC TGT AAT TAA CTG-3' e R2 -5'-CTC ATC TTT TCA TTA TGT CAG AG-3', como descrito previamente⁽²²⁾. As condições da PCR são: desnaturação inicial de 94°C/5 min seguido de 30 ciclos de 94°C/45 seg, 52°C/45 seg, 72°C/1 min e a 72°C/7 min de extensão final. Os produtos amplificados foram digeridos pela enzima de restrição MunI (Fermentas, Ottawa, ON Canadá), e submetidas a eletroforese com gel agarose a 3%. O gel de agarose foi corado utilizando brometo de etídio e analisado no Alpha Imager 2200 (Alpha Innotech Corporation™, San Leandro, CA USA). Após o

procedimento, três resultados diferentes foram encontrados: um fragmento de 349pb correspondente ao genótipo homozigoto TT, e dois fragmentos: 202pb e 147pb correspondente ao genótipo homozigoto AA ou fragmentos de 349pb, 202pb e 147pb correspondente ao genótipo heterozigoto TA.

Análise estatística

A análise estatística, utilizada para verificar associação entre as variáveis, foi realizada através do teste χ^2 , trabalhando com um nível de confiabilidade de 95% e considerando significativos os resultados com índice estatístico $p < 0,05$. As análises foram realizadas no software SPSS 16.0.

Resultados

O *Helicobacter pylori* foi detectado em 107 pacientes (66.9%) (idade média 43.3 ± 15.0), assim, 53 (33.1%) pacientes foram considerados negativos para a infecção pelo *H. pylori* (idade média 51.6 ± 17.7) ($p < 0.0001$).

As tabelas 1 e 2 mostram a distribuição do genótipo da IL-8 -251T>A e dos gêneros entre as amostras positivas e negativas, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas significativas em relação à distribuição de genótipo e gênero entre os pacientes positivos e/ou negativos para a infecção pelo *H. pylori*.

Discussão

Este estudo foi o primeiro a investigar, em indivíduos brasileiros, uma possível associação entre o polimorfismo IL-8 -251T>A e o risco de infecção pelo *Helicobacter pylori*, porém não foi encontrada nenhuma associação entre o polimorfismo da IL-8 -251T>A, o risco de infecção por *Helicobacter pylori* e o gênero destes pacientes.

Cheng et al. (23), e colaboradores, estudando 628 pacientes dispépticos e 176 controles encontraram resultados semelhantes aos nossos, pois não encontraram associação do polimorfismo da IL-8 -251T>A com um aumento no risco de refluxo esofágico erosivo ou gastrite em pacientes Tailandeses, assim como Canedo et al. (24), que também não encontraram associação significativa entre o polimorfismo IL-8 -251T>A e aumento no risco de gastrite crônica ou carcinoma gástrico na população do norte de Portugal. No entanto, vários estudos relataram resultados controversos.

Hofner et al. (25), descrevem resultados que mostram uma associação entre o genótipo heterozigoto da IL-8 (TA) e risco de gastrites ou úlceras duodenais em pacientes infectados pelo *H. pylori*. Song et al. (27), relatam que a IL-8 é um potente fator antigênico e tem um papel fundamental na inflamação da mucosa gástrica de pacien-

tes infectados pelo *H. pylori*. Seu estudo conta com 395 pacientes coreanos; 92 controles normais, 87 controles infectados por *H. pylori*, 108 pacientes com gastrite crônica e/ou metaplasia intestinal e 108 com adenocarcinoma e conclui que o genótipo homozigoto AA pode estar associado com a angiogênese em indivíduos infectados pelo *H. pylori*.

Ohyuchi et al. (27) e Taguchi et al. (28) verificaram que o genótipo AA confere maior risco a gastrite atrófica em comparação com o genótipo TT. Estes autores ainda associaram os genótipos AA e TA a níveis elevados de IL8 e maior grau de infiltração de neutrófilos quando comparadas com o genótipo TT.

Essa diversidade de resultados pode estar relacionada principalmente à diferente área geográfica, população estudada, número amostral, hábitos alimentares, condições sociais e higiene pessoal. É importante ressaltar que a IL-8 é uma importante citocina inflamatória e estudos posteriores são importantes para esclarecer o seu papel nas doenças gástricas.

Em resumo, nossos resultados sugerem que o polimorfismo da IL-8 -251T>A parece não estar associado ao risco da infecção pelo *H. pylori*, porém é um polimorfismo biologicamente importante na patogênese das doenças gástricas e necessita de mais estudos em diferentes populações, já que em algumas populações esse polimorfismo parece ser fundamental no desenvolvimento das doenças gástricas.

Agradecimento

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, BRASIL), Nº - 06/60836-1, Universidade Sagrado Coração de Bauru (USC) e Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA).

Referências

1. Erzin Y, Koksall V, Altun S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2. Genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter* 2006; 11:574–80.
2. Huang Zhi-Gang, Guang-Cai Duan, Qing-Tang Fan, et al. Mutation of cytotoxin-associated gene A affects expressions of antioxidant proteins of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 599–606.
3. Nahar S, Kibria KM, Hossain ME, et al. Evidence of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by PCR-based RAPD fingerprinting in Bangladesh. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 767-73.
4. Mitchell A, Silva TM, Barrett LJ, Lima AA and

- Guerrant RL. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1326–28.
5. Tseng FC, Brown EE, Maiese EM, et al. Polymorphisms in cytokine genes and risk of *Helicobacter pylori* infection among Jamaican children. *Helicobacter* 2006; 11:425-530.
 6. Souto FJ, Fontes CJ, Rocha GA, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural área of the states of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 171-74.
 7. Mitchell HM. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 241: 11–30.
 8. Brito CAA, Silva LMB, Jucá N, Leal et al. Prevalence of *cagA* and *vacA* Genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 817-21.
 9. Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *J Med Microbiol* 2008; 57:545-553.
 10. Kignel S, De Almeida Pina, Andre EA, Alves Mayer MP and Birman EG. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral Microbiology* 2005; 11: 17-21.
 11. De Vries AC and Kuipers EJ. *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 25–35.
 12. Nouraie M, Latifi-Navid S, Rezvan H, et al. Childhood hygienic practice and family education status determine the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Iran. *Helicobacter* 2009; 14: 40-6.
 13. Misiewicz JJ. Current insights in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 701-3.
 14. Siqueira JS, Lima PSS, Barreto AS, Quintans-Juinor LJ. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori*– Revisão. *RBAC*. 2007; 39(1): 9-13.
 15. Zlotnik A and Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12(2):121-7.
 16. Baggiolini M, Dewald B and Moser B. Interleukin 8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55:97-179.
 17. Zhang QB, Etolhi G, Dawodu JB, Gemmell CG and Russell RI. Relationship between mucosal levels of *Helicobacter pylori* specific IgA, interleukin-8 and gastric inflammation. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96:409-14.
 18. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S and Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 2:58–60.
 19. Zhong-Wu Li, Ying Wu, Yu Sun, et al. Inflammatory cytokine gene polymorphisms increase the risk of atrophic gastritis and intestinal metaplasia. *World J Gastroenterol* 2010; 14: 16(14): 1788-94.
 20. Schultze V, Hackelsberger A, Günther T, et al. Differing patterns of *Helicobacter pylori* gastritis in patients with duodenal, prepyloric, and gastric ulcer disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:137–42.
 21. Scholte GH, van Doorn LJ, Quint WG and Linderman J. Polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublime fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *Diag Mol Pathol* 1997; 6:238-43.
 22. Hamajima N, Katsuda N, Matsuo K, Saito T, Hirose K, Inoue M, Zaki TT, Tajima K and Tominaga S. High anti-*Helicobacter pylori* antibody seropositivity associated with the combination of IL-8-251TT and IL-10-819TT genotypes. *Helicobacter* 2003; 8:105-10.
 23. Cheng HH, Chang CS, Wang HJ and Wang WC. Interleukin-1beta and -10 polymorphisms influence erosive reflux esophagitis and gastritis in Taiwanese patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(8):1443-51.
 24. Canedo P, Castanheira-Vale AJ, Lunet N, et al. The interleukin-8-251 T>A polymorphism is not associated with risk for gastric carcinoma development in a Portuguese population. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17(1):28-32.
 25. Hofner P, Gyulai Z, Kiss ZF, et al. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter* 2007; 12(2):124-31.
 26. Song JH, Kim SG, Jung SA, Lee MK, Jung HC and Song IS. The interleukin-8-251 AA genotype is associated with angiogenesis in gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori* infected Koreans. *Cytokine* 2010; 51(2):158-65.
 27. Ohyauchi M, Imatani A, Yonechi M, Asano N, Miura A, Iijima K, Koike T, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T: The polymorphism interleukin 8 -251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. *Gut* 2005, 54:330-35.
 28. Taguchi A, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H: Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:2487-93.

Tabela 1 - Frequência genotípica absoluta e relativa do polimorfismo da IL-8 em amostras positivas e negativas para a infecção pelo H. pylori (HP)

Diagnóstico \ Genótipo	TA	TT	AA	Total
HP Positivo	59 (55.5%)	28 (26.5%)	20 (18%)	107
HP Negativo	26 (49%)	17 (32%)	10 (19%)	53
Total	85 (53%)	45 (28%)	30 (19%)	160

Tabela 2 - Frequência genotípica do polimorfismo da IL-8 distribuída por gênero.

Genótipo \ Gênero	TA	TT	AA	Total
Masculino	48	18	15	81
Feminino	37	27	15	79
Total	85	45	30	160

Endereço para correspondência:

Spencer Luiz Marques Payão, Ph.D,
 Laboratório de Genética, Hemocentro, Famema,
 Rua Lourival Freire, 240,
 Bairro Fragata, Marília, São Paulo, Brazil.
 CEP 17519-050,
 E-mail: slmpayao@famema.br