

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO *HELICOBACTER PYLORI* EM MUCOSA GÁSTRICA¹

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION IN THE GASTRIC MUCOSAL

Renato Santana LUSCENTI² e Luciano Lobo GATTI³

RESUMO

Introdução: *Helicobacter pylori* uma bactéria que coloniza mucosa gástrica, associada fortemente com doenças gástricas e adenocarcinoma gástrico. Interações que envolvem fatores ambientais, do hospedeiro e da bactéria têm sido associadas com a progressão da doença gástrica e fatores de virulência, como a citotoxina vacualizante (*vacA*), e citotoxina associada (*cagA*), têm sido associados como fatores de virulência da bactéria. **Objetivo:** padronização do Diagnóstico Molecular da Infecção pelo *Helicobacter pylori* no Laboratório de Biologia Molecular das Faculdades Integradas de Ourinhos. **Método:** extração de DNA de biópsia gástrica, através do Kit Wizarg SV Genomic DNA Purification e Reação em Cadeia da Polimerase utilizando primers que amplificam genes específicos do *Helicobacter pylori*. **Resultados:** todas as amplificações foram padronizadas de acordo com as condições utilizadas com os primers específicos para amplificação gênica do *H. pylori*. **Considerações Finais:** o estudo proposto alcançou seus objetivos que foi a padronização molecular da infecção pela bactéria *H. pylori* em mucosa gástrica de indivíduos infectados, fornecendo desta forma uma nova ferramenta e técnica extremamente sensível para detecção da infecção pelo bactéria de maneira rápida e precisa.

DESCRITORES : *Helicobacter pylori*, Diagnóstico Molecular da Infecção, doenças gástricas

INTRODUÇÃO

A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é considerada a principal causa de gastrite crônica ativa¹. Estudos sugerem que esse agente desempenha importante papel na gênese da úlcera péptica².

Vários estudos indicam um dano progressivo à mucosa gástrica induzido pela infecção do *H. pylori*, sendo os sintomas clínicos frequentemente diagnosticados na fase adulta do indivíduo, porém a aquisição da infecção geralmente ocorre na infância^{3,4}. Esses dados são de grande importância, pois é demonstrado que a duração da infecção está

¹ Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular das Faculdades Integradas de Ourinhos – FIO.

² Graduando do Curso de Ciências Biológicas das Faculdades Integradas de Ourinhos e Estagiário do Laboratório de Biologia Molecular das FIOs

³ PhD. Geneticista, Professor Doutor e Pesquisador das Faculdades Integradas de Ourinhos e Coordenador do Projeto de Detecção e Polimorfismos do *Helicobacter pylori* no Laboratório de Biologia Molecular das Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO

diretamente associada ao desenvolvimento de patologias gástricas, particularmente a doença ulcerativa péptica e o carcinoma gástrico⁵.

Em 1994, a bactéria foi classificada com um carcinógeno do Tipo I para câncer de estômago pelo International Agency for Research on Câncer (órgão este subordinado à Organização Mundial da Saúde)⁶.

Outras afecções além das gastrites, úlceras e carcinoma gástrico também estão associadas a infecção pelo *H. pylori*, são: linfoma de tecido linfóide associado à mucosa gástrica, dispepsia não-ulcerativa⁷, doenças coronarianas e cardiovasculares^{8,9}, urticária idiopática crônica^{10,11}.

O mecanismo exato de transmissão da bactéria ainda é desconhecido. O único fator, universalmente, aceito é de que a mesma só consegue alcançar a mucosa gástrica através da boca, pois trata-se de um microorganismo não-invasivo¹². Estudos detectaram a presença do *H. pylori* na cavidade oral, através de técnicas de cultura microbiológica ou PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de materiais como saliva e placa dentária^{13,14}, sendo que a cavidade oral tem sido proposta como um reservatório da infecção e reinfecção do *H. pylori*, pois a regurgitação do suco gástrico pode contaminar a boca¹⁵.

Vários estudos sugerem uma importante participação na transmissão da bactéria por via oral-oral^{16,17,18,19}.

A busca por fatores de virulência da bactéria os quais poderiam estar envolvidos na patogenicidade do *H. pylori* levou ao isolamento de uma proteína denominada citotoxina vacuolizante (*vacA*) a partir do sobrenadante de cultura²⁰ e de uma proteína de alto peso molecular denominada de Proteína Citotoxina Associada, que encontra-se envolvida no processo de inflamação da mucosa gástrica através do estímulo da liberação de interleucina-8 pelas células gástricas infectadas pela bactéria²¹.

Estudos realizados por Gatti et al., anteriormente demonstraram a associação dos genes *cagA* e *vacA* na gênese de doenças gástricas como gastrite crônica e doença ulcerativa, relevando a importância da detecção e genotipagem das cepas de *H. pylori* em mucosa gástrica^{22,23,24}.

OBJETIVO

Visto a importância do envolvimento da bactéria na gênese de doenças gástricas, esta pesquisa objetivou em padronizar o diagnóstico molecular através da Técnica de PCR no Laboratório de Biologia Molecular das Faculdades Integradas de Ourinhos, proporcionando aos médicos gastroenterologistas um meio de diagnóstico e genotipagem molecular da bactéria, possibilitando, desta forma, um diagnóstico preciso e sensível, além da determinação genotípica da bactéria ajudando no prognóstico da infecção, uma vez que é sabido das consequências e envolvimento dos genes de virulência do *H. pylori* com o decorrer dos anos de infecção crônica.

MÉTODO

Amostras

Foram utilizados biópsias gástricas de pacientes adultos do sexo masculino e feminino os quais submeteram-se a esofagogastroduodenoscopia por indicação médica prévia, onde foram coletadas amostras para o teste da Uréase para o diagnóstico bioquímico da bactéria e uma biópsia do antro gástrico para realização da extração do DNA genômico e detecção do DNA da bactéria, utilizando-se de Iniciadores (*primers*) específicos para amplificação de genes do *H. pylori*.

Extração do DNA

A extração do DNA da biópsia gástrica foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pelo Kit Wizard SV Genomic DNA Purification-Promega, no qual consiste na lise das células; em seguida, este lisado é colocado em contato com uma coluna para sua adsorção e, posteriormente, são realizadas lavagens da resina contendo o DNA com soluções descontaminantes, sendo, posteriormente, este eluído e ressuspenso em tampão apropriado, para que seja realizado as técnicas de amplificação gênica dos fragmentos específicos para diagnóstico da bactéria.

Primers utilizados para diagnóstico da Infecção pelo *H. pylori* e condições da PCR

Para a detecção molecular do *H. pylori* através da técnica da PCR, foram utilizados dois

pares de *primers* denominados de H3/H4, H5/H6 e HPX/HPX1 (Tabela 1), os quais amplificam um fragmento de 296pb do gene que codifica uma proteína antigênica de 26 kDa espécie específica, 411pb do gene da UreaseA e 150pb referente a um fragmento do rRNA 16S do *H. pylori* respectivamente.

Condições da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As condições para realização da Técnica da PCR para o diagnóstico molecular da infecção pelo *H. pylori* com a utilização de primers específicos encontram-se esquematizadas na tabela 2.

Visualização dos fragmentos de DNA amplificados pela Técnica da PCR

Os fragmentos de DNA amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com SYB – Safe DNA Gel Stain, documentados e analisados por Sistema de Captura de Imagem.

Tabela I. Descrição dos Primers utilizados para Diagnóstico do *H. pylori*

Primer	Seqüência (5' - 3')	Ref
H3	TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC	25
H4	CCTGCTGGGCATACTTCACCATG	25
H5	GCCAAATGGTAAATTAGTT	26
H6	CTCCTTAATTGTTTTTAC	26
HPX	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	27
HPX1	GAGGAATACTCATTGCGAAGGCGA	27

Ref. = Referencias

Y, corresponde a C ou T e R, corresponde a A ou G.

Tabela II. Condições da Reação em Cadeia da Polimerase

Primer	Condição da PCR
H3/H4	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/60°C 1'/ 72°C 1'e 72°C 7'
H5/H6	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/45°C 1'/ 72°C 1'e 72°C 7'
HPX/HPX1	94°C 5', 40 ciclos 94°C 1'/59°C 1'/ 72°C 1'e 72°C 7'

RESULTADOS

Todas as ampliações foram padronizadas de acordo com as condições utilizadas na tabela 1, utilizando em cada reação 2µl de DNA genômico (50ng), 2µl de cada primer (10mM), 0,2µl de *Taq DNA polimerase* (1 unidade), 5µl de PCR Buffer (10x), 2µl MgCl2 (50mM) e 5µl de Dntps, completando o volume para 50µl de reação com água destilada pura.

Em todas as reações foram incluídos controles positivos (amostras sabidamente positivas para presença do *H. pylori*) e controle negativo (água ultra pura estéril). Os resultados das ampliações encontram-se na figura 1.

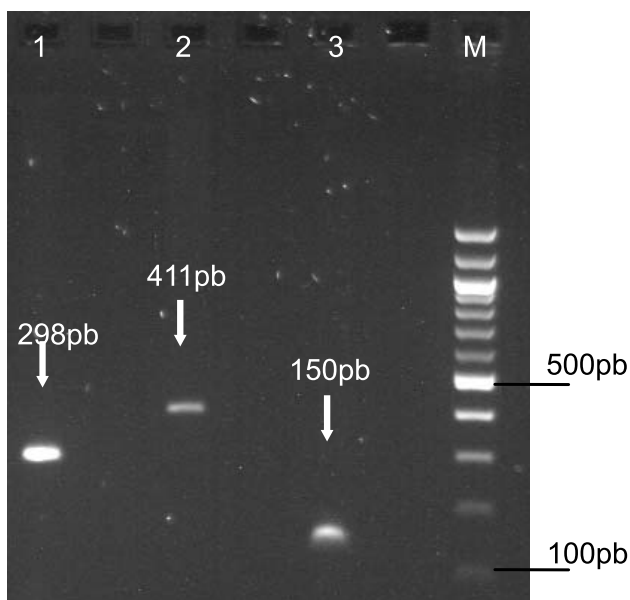


FIGURA 1 - Gel de agarose a 2%, corado com SYB – Safe DNA Gel Stain, onde 1 refere-se a amplificação do primer H3/H4, 2 refere-se a amplificação do primer H5/H6, 3 refere-se a amplificação do primer HPX/HPX1 e M refere-se ao marcador de peso molecular (100pb).

DISCUSSÃO

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método muito sensível para o diagnóstico de *H. pylori* e para alguns autores a técnica é o mais sensível método para tal diagnóstico²⁸. Segundo estudo realizado por Junior FA e colaboradores em 2004²⁸, os mesmos constataram uma sensibilidade semelhante dos testes da uréase, histológico e PCR na detecção do *H. pylori* no estômago de crianças infectadas.

Já estudos realizados por Dzierzanowska *et al*²⁹, utilizando os *primers* com as mesmas seqüências do H3/H4 e H5/H6 constataram que o método de PCR identificou um maior número de casos de indivíduos infectados com *H. pylori* em relação à cultura de tecido. Segundo ainda estudos realizados por Junior FA e colaboradores, em 2004, não existem diferenças entre a coleta de biópsia do antro e corpo do estômago para detecção molecular da bactéria, resultado este já obtido em estudos anteriores realizados por Carvalho e colaboradores³⁰.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo proposto alcançou seus objetivos que foi a padronização molecular da infecção pela bactéria *H. pylori* em mucosa gástrica de indivíduos infectados, fornecendo, desta forma, uma nova ferramenta e técnica extremamente sensível para detecção da infecção pelo bactéria de maneira rápida e precisa.

SUMMARY

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION IN THE GASTRIC MUCOSAL

Renato Santana LUSCENTI e Luciano Lobo GATTI

Introduction: *Helicobacter pylori* a bacterium to colonize human gastric mucosa, has been strongly associated with gastric diseases and gastric cancer. Interactions involving environmental, host and bacterial factors seem to associated with gastric diseases progression and virulences factors like vacuolating cytotoxin (*vacA*), and Associated Cytotoxin (*cagA*), has been associated like virulence factors from bacterium. **Objective:** standardization of Molecular Diagnostics of infection by *Helicobacter pylori* in the Laboratory of Molecular Biology of the Faculty of Integrated Ourinhos. **Methods:** DNA extraction from gastric biopses through the kit Wizarg SV Genomic DNA Purification and Polymerase Chain Reaction using primers that amplified specific genes from *Helicobacter pylori*. **Results:** all amplifications were standardized in accordance with the terms used with specific primers for amplification of the gene *H. pylori*. **Final Considerations:** the proposed study has achieved its objectives which was the standardization of molecular infection by the bacteria *H. pylori* in gastric mucosa of infected individuals, thus providing a new tool and extremely sensitive technique to detect infection by the bacteria quickly and accurately

KEY WORD : *Helicobacter pylori*, Molecular Diagnóstico Infection, Gastric Diseases

REFERÊNCIAS

1. KAWAGUCHI H; HARUMA K; KOMOTO K; YOSHIHARA M; SUMII K; KAJIYAMA G. *Helicobacter pylori* infection is the major risk factor for atrophic gastritis. *Am. J. Gastroenterol.* v.51, p.959-962, 1996.
2. RAUWS EAJ; TYTGAT GNJ. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* V.335, p.1233-1235, 1990.
3. BONAMICO M; MARIANI P; MAGLIOCCA FM; PETROZZA V; MONTUORI M; PEZZELA C; LUZZI I; CARPINO F. *Helicobacter pylori* duodenal colonization in children. *Acta Paediatr.* V86, p.356-360, 1997.
4. ERNEST PB; GOLD BD. *Helicobacter pylori* in childhood: new insights for managing infection in children. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* V. 28, p. 462-473, 1999.
5. BOURK B; JONES N; SHERMAN PM. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease in children. *Pediatric Infect Dis.* v 15, p. 1-13, 1996
6. IARC. Shistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon France: IARC 1994.
7. BARDHAN PK; ISLAM M; MAHALANABIS D. A study of *Helicobacter pylori* in Bangladesh subjects with non-ulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* V.89, p.1301

8. PATEL P; MENDALL MA; CARRINGTON D; STRACHAN DP; LEATHAN E; MOLINEAUX N et al. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* vol.311, P. 711-714, 1995.
9. OZDOGRU I; KALAY N; DOGAN A; INANC MT; KAYA MG; TOPSAKAL R; GUL I; KUTUKOGLU I; KILIC H; ERYOL NK. The relationship between *Helicobacter pylori* IgG titre and coronary atherosclerosis. *Acta Cardiol.* vol.62, pg. 501-5, 2008.
10. TEBBE B; GEILEN CC; SCHULZKE JD. *Helicobacter pylori* infection and chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol.* Vol.34, p. 685-686, 1996
11. YADAV MK, RISHI JP, NIJAWAN S. Chronic urticaria and *Helicobacter pylori*. *Indian J Med Sci.* vol.62, pg.157-62, 2008.
12. KODAIRA MS; ESCOBAR AMU; GRISI S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Rev saúde Pública*, vol.36, pg. 356-359, 2002.
13. SALMANIAN AH; SIAVOSHI F; AKBARI F; AFSHARI A; MALEKZADEH R. Yeast of the oral cavity is the reservoir of *Helicobacter pylori*. *J Oral Pathol Med.* Feb 5, 2008.
14. LOSTER BW; MAJEWSKI SW; CZECENIKIEWICZ-GUZIK M; BIELANSKI W; PIERZCHALSKI P; KONTUREK SJ. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach. *J Physiol Pharmacol.* vol.57 Suppl 3, pg. 91-100, 2006.
15. DESAI HG; GILL HH; SHANKARAM K; MEHTA PR; PRABHU SR. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? *Scand J gastroenterol*, vol.26, pg. 1205-1208, 1991.
16. GOODMAN JK; CORREA P; AUX HJT; RAMÍREZ H; DELANY JP; PEPINOSA OG; ET AL. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes : a population-based study of transmission pathways. *Am J. Epidemiol.* Vol. 144, pg. 290-299, 1996.
17. ALBENQUE M; TALL F; DABIS F; MÉGRAUD F. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in África. *Rev Esp Enferm Dig*, vol. 78, pg. 48, 1990
18. CLEMENS J; ALPERT MJ; RAO M; HUDAS; QADR F; VAN LOON FPL; ET AL. Sociodemographic, higienic and nutritional correlates of *Helicobacter pylori* infection of young Bangladeshi children. *Pediatr Infect Dis J.* Vol.15, pg. 1113-1118, 1996.
19. SHAHAMAT M; VIVES-REGO J; PASKO-KOLVA C; PEARSON AD; COLWELL RR. Survival of *Campylobacter pylori* in river water. *Klin Wochenschr* vol. 67, pg. 63, 1989.
20. ATHERTON JC; PEEK RM; THAM KT; COVER TL; BLASER MJ. Clinical and pathological importaqnce of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, vol. 112, pg. 92-99, 1997.
21. KIM SY; LEE YC; KIM HK, BLASER MJ. *Helicobacter pylori* *cagA* transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cell Microbiol.* Vol.8, pg. 97-106, 2006.
22. GATTI LL; LABIO RW; SILVA LC; SMITH MAC; PAYÃO SLM. *cagA* positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. *Braz J Infect Dis.* Vol. 10, pg. 253-257, 2006.
23. GATTI LL; SOUZA EK; LEITE KR; BASTOS ELS; VICENTINI LR; SILVA LC; SMITH MAC; PAYÃO SLM. *cagA vacA* alleles and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. *Diag. Microbiol Infec Dis.* vol 51, pg. 231-235, 2005.
24. GATTI LL; JUNIOR FA; LABIO RW; PIASON FB; SILVA LC; QUEIROZ VF; BARBIERE DP; SMITH MAC; PAYÃO SLM. *Helicobacter pylori* and *cagA* and *vacA* gene status in children from Brazil with chronic gastritis. *Clin Exp Med.* Vol. 3, pg. 166-172, 2003.
25. HAMMAR M; TYSZKIEWICZ T; WADSTROM T; O´TOOLE PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* Vol. 30, pg. 54-58, 1992
26. CLAYTON C; KLANTHOUS K; TABAGCHALI S. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* Vol. 44, pg. 515-516, 1992.
27. SCHOLTE GH; VAN DOORN LJ; QUINT WG; LINDEMAN J. Polymerase chain Reaction for detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimated, paraffin-embedded gastric biopsias. *Diag Mol. Pathol.* Vol. 6, pg. 238-243, 1997.
28. JUNIOR FA; PAYÃO SLM; QUEIROZ VF; ELLINGER F; SILVA LC; THEREZO ALS; GATTI LL; BARBIERE D; PERES CA. Detecção gástrica de *Helicobacter pylori* em pacientes pediátricos sintomaticos através da reação em cadeia da polimerase (PCR), teste de uréase e exame histológico. *Pediatria (São Paulo)*, vol. 26, pg. 34-42, 2004.
29. DZIERZANOWSKA D; GZYL A; ROZYNEK E. PCR for identification and typing of *Helicobacter pylori* isolated from children. *J Physiol. Pharmacol* vol. 47, pg. 101-114, 1996.
30. CARVALHO AS; QUEIROZ DM; MENDES EN; ROCHA GA; PENNA FJ. Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of symptomatic children. *Braz J Med Biol Res.* vol.24, pg. 163-166, 1991.

Endereço para Correspondência :

Prof. Dr. Luciano Lobo Gatti

Laboratório de Biologia Molecular

Faculdades Integradas de Ourinhos – FIO

Rodovia BR153 Km339 + 400m - Bairro Água do Cateto - Ourinhos/SP

e-mail: lobogatti@yahoo.com.br

Fone : 14 – 3302 6400 (Ramal 459)