

**DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DA INTERLEUCINA-8 (BASE -251A/T)  
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR-RFLP  
EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS DAS FIO**

**DETERMINATION OF INTERLEUKIN-8 POLYMORPHISM (BASE -251A/T)  
THROUGH OF PCR-RFLP  
IN FIO STUDENTS UNIVERSITY FIO**

<sup>1</sup>PINHA, J. C.A; <sup>2</sup>GATTI, L. L.

<sup>1,2</sup>Departamento de Ciências Biológicas das Faculdades Integradas de Ourinhos/FIO-FEMM

**RESUMO**

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza o estomago dos seres humanos e relaciona-se com doenças gastroduodenais. Trata-se de um bacilo gram- adquirido na infância, o qual adere as células do epitélio gástrico lesionando-as. A interação Parasita x Hospedeiro na infecção requer produção de hormônios de ativação leucocitária, sendo estes as interleucinas, e a produção e secreção controlada das mesmas são consideradas como fator genético do hospedeiro no desenvolvimento de patologias gástricas. A interleucina – 8 é responsável pela ativação de neutrófilos em resposta a infecção pelo *H. pylori* e sua secreção é nivelada pela mucosa de acordo com o dano tissular provocada pelo bacilo. O gene *IL- 8* localiza –se no cromossomo 4(4q13q21), e assim como qualquer outro, possui uma região promotora. Na base – 251 dessa região há uma mutação envolvendo as bases adenina e timina que confere a esse gene 2 alelos: -251A e -251T. Diversas associações envolvendo esse polimorfismo já foram feitas demonstrando suas interações gênicas e manifestação clínica antagônicas e sugestivas. Com base nessa heterogeneidade de associações, este estudo procurou genotipar o gene *IL-8* em um grupo de 100 estudantes saudáveis das FIO, visto a importância dos mesmos em processos inflamatórios. No presente estudo foi observado que o genótipo implicado na potencialização de processos inflamatórios é de baixa incidência em uma população de indivíduos saudáveis, sendo o genótipo de maior frequência o heterozigoto.

Palavras-chave: Interleucina-8, *Helicobacter pylori*, Doenças gastroduodenais.

**ABSTRACT**

The *Helicobacter pylori* is bacterium that colonizes the stomach of humans and related with diseases gastroduodenal. Is a gram-negative bacillus acquired often in infancy that adhere as gastric epithelial cells inciting lesion. The interanation Parasite x Host in infection require the production of hormones of activation neutrophils and lymphocytes, as interleukins, whose production and secretion control theirs are considered with genetic factor host in development de gastrices disease. The Interleukin-8 is responsible of activation and secretion is leveled by gastric mucoses on agreement with the aggression histologic provoked by bacillus. The gene Interleukin-8 is localized in chromosome 4 (4q13-q21). The gene *IL-8*, how any other, have is a sequency of DNA situate in your portion 5' in what is start a transcription, is a promoter region. To heve a mutation involving basis adenina and timina (A/T) what give that gene two alleles: -251A e -251T. Vary associations, involving that polymorphisms already gove made demonstrated your interaction genics and manifestation clinics antagonics and suggestion. With base in variety of association, this study looked to evidence the frequency of the genotypes *IL-8*, base-251 (AA-AT or TT) in students healthy of that FIO. In the present study it was observed that the genotype implied in the potencialização of inflammatory processes is of low incidence in a population of healthful individuals, being the genotype of bigger frequency heterozigoto.

keywords: Interleukin-8, *Helicobacter pylori*, Diseases gastroduodenal

## INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* é freqüentemente associado às doenças gastroduodenais e já foi classificado como importante carcinógeno humano; apesar da incidência de câncer gástrico variar de acordo com outros fatores. (OHYAUCHA; et al 2004).

Por observação sugeriu-se que a infecção pelo *H.pylori* nem sempre associa-se como o risco de doenças gástricas, assim como alguns fatores genéticos dos hospedeiros são considerados participantes na variedade de efeitos clínicos induzidos pela bactéria. De qualquer modo, somente menos de 3% dos indivíduos portadores de *H.pylori* desenvolvem neoplasias gástricas indicando que outros fatores estão envolvidos. (LEE et al 2005).

De acordo com LEE et al. (2005) a progressão gástrica maligna está provavelmente combinada com efeitos da patogenicidade bacteriana, da susceptibilidade genética do hospedeiro e de fatores ambientais, como as interleucinas 1 beta, interleucina 10 e interleucina 8 as quais são potentes citocinas pró inflamatórias de produção estimulada pela infecção da bactéria *H.pylori*.

SARVESTANI et al. (2006) relata que a variedade de resultados clínicos de *H.pylori* induzindo patologias são multifatoriais e envolvem complexas interações entre as resposta imune do hospedeiro, fatores de virulência do patógeno (como os genes *cagA* e *vacA*) e características ambientais. Os mesmos, relatam o gene *cagA* como uma família específica de gene *H.pylori* classificado como um marcador do grupo, o qual confere aumento do risco de doenças gástricas, como o câncer gástrico, enquanto o gene *vacA* (presente em todas as famílias *H.pylori*) quando administrado oralmente em camundongos induz a úlceras gástricas. Considerando os fatores genéticos HULL et al. (2000) relataram uma associação entre o vírus da inflamação dos brônquios respiratórios e o alelo IL-8 -251A em algumas famílias. Desde o relato de HULL, outros estudos observaram os efeitos deste alelo sobre as doenças inflamatórias. Diversos relatos têm mostrado relação entre o polimorfismo de IL-8 e o mais enfocado e o polimorfismo IL-8 base -251A/T. Outro estudo realizado por OHYAUCHI et al. (2004) com pacientes japoneses evidenciou que o alelo -251A estava relacionado com a alta atividade promotora da IL-8 em pacientes com doenças gástricas, quando comparado com o correspondente do grupo controle, demonstraram também que a infecção *H. pylori* não é mostra prevalente em nenhum genótipo IL-8 e que a exposição do organismo

ao bacilo por muito tempo e um fator de risco significativo para a atrofia gástrica e para metaplasia intestinal. Entretanto outro estudo realizado por LEE et al. (2005) associou o alelo -251T como fator de risco para a asma e para o desenvolvimento da Doença de Parkinson.

OMAR et al. (2000) relatam que o polimorfismo gênico da IL – 1 e o seu receptor antagonista (IL – 1RN) estão associados com o aumento do risco de câncer gástrico na população caucasiana proveniente da Polônia e da Escócia, estudos estes também confirmados por GATTI et al. (2004) com pacientes com adenocarcinoma gástrico no norte do Brasil.

De acordo com KOCHAE et al. (2001); NICKLOFF et al. (1994); XAUBETA et al. (1998) a interleucina-8 medeia a vascularização em ratos, sendo considerada como uma importante implicação na angiogênese e na variedade de doenças, como a psoríase, artrite reumatóide, idiopatia fibrosa pulmonar e algumas neoplasias.

De acordo com SARVESTANI et al. (2006) em células do carcinoma gástrico surgem espécies de IL-8 super expressas, comparadas com a correspondente normal da mucosa, e o RNAm produzido por elas está diretamente correlacionado com a vascularização de tumores. Foi proposta uma relação entre indivíduos com gastrites e portadores de genótipo IL-8 -251A no desenvolvimento de atrofia gástrica, a qual pode levar ao aparecimento do câncer gástrico (CORREA et al. 1992).

Entretanto, outro estudo realizado com pacientes do norte de Taiwan, evidenciou uma associação significativa entre o alelo -251T e o risco de carcinoma gástrico do tipo difuso (LEE et al. 2005). Neste trabalho foi analisado a atividade promotora dos alelos -251A e -251T e nos pacientes estudados o alelo -251T mostrou atividade elevada.

Em todos os estudos realizados até o momento, fica clara a necessidade de relacionar os genótipos referentes à IL-8 com outros fatores de riscos no desenvolvimento de doenças gástricas e suas progressões malignas. O objetivo geral do presente estudo visa detectar o polimorfismo da IL-8, base – 251, em jovens saudáveis (alunos das Faculdades Integradas de Ourinhos) através da técnica de PCR – RFLP, visto a importância do mesmo em processos inflamatórios.

## MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do sangue periférico para extração do DNA genômico será realizada através da punção venosa e o mesmo colocado em tubo de ensaio com anticoagulante E.D.T.A. (Etileno diaminotetracético). A extração do DNA genômico será realizada conforme protocolo estabelecido pelo fornecedor do Kit Purê Link genomic DNA Purification - Invitrogen e consiste em:

- Isolamento e extração do pellet de leucócitos através da centrifugação do sangue a 3500 rpm por 8 minutos.

- Em tudo eppendorf adicionar 200 ul do pellet de leucócitos, 10ul de SDS 5%, 20 ul da enzima proteinase k e 200 ul do tampão de ligação de DNA. Incubar 10 minutos á 70°C.

- Adicionar 200 ul de Etanol Absoluto para precipitação do DNA e tranferir todo o material para coluna contendo sílica com afinidade pelo DNA.

- Centrifugar 14.000 rpm por 1 minuto á 4° C.

- Fazer duas lavagens com tampão A4.

- Fazer duas lavagens com tampão A5.

Centrifugar para secar os tubos coletados.

Adicionar 200 ul de solução de eluição; centrifugar 14.000 rpm por 1 minuto e estocar em geladeira 4°C para posterior uso .Para ampliação do fragmento gênico da IL-8 na qual possui o polimorfismo (A/T) na base – 251 foi utilizado a seqüência do gene bank.

As primers utilizados para ampliação foram: IL-8 F1 5' CAT GAT AGC ATC TGT AAT TAA CTG 3' e IL-8 F2 5' CTC ATC TTT TCA TTA TGT CAG AG 3' ao quais amplificam um fragmento de 349pb (pares de bases) onde encontra-se a região - 251 referente ao polimorfismo em questão.

Para que seja amplificado tal fragmento as condições do PCR serão: 94°C durante 5 minutos e 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e para finalizar 72°C por 7 minutos. A reação em cadeia da polimerase consiste na ampliação de um seguimento gênico o qual é delimitado com a utilização de “primers” (iniciadores) o qual irão delimitar o fragmento gênico a ser amplificado.

A técnica consiste em três etapas principais sendo:

- Primeira etapa: as fitas do DNA são separadas por um aumento da temperatura através do termociclador (desnaturação do DNA).

- Segunda etapa: os primers (sense e antisense) se associam em regiões complementares servindo de “molde” para amplificação gênica.

- Terceira etapa: refere-se à etapa de extensão onde a enzima Taq DNA Polimerase, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* a qual fixa os nucleotídeos livres formando novas fitas de DNA. A região polimórfica contém o sítio de restrição para enzima *MfeI*, na posição -251 do sítio de início da transcrição do gene. A amplificação e posteriormente digeridos com enzima *MfeI*. Os produtos esperados são:

- Fragmentos gerados pela restrição: T - 349pb

A – 202 pb e 147pb

A visualização da digestão foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Syber Safe.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do DNA genômico, foi realizada conforme protocolo estabelecido pelo fabricante do kit e todas as amostras após extração foram visualizadas em gel de agarose para confirmação da correta extração, de acordo com Figura 1.

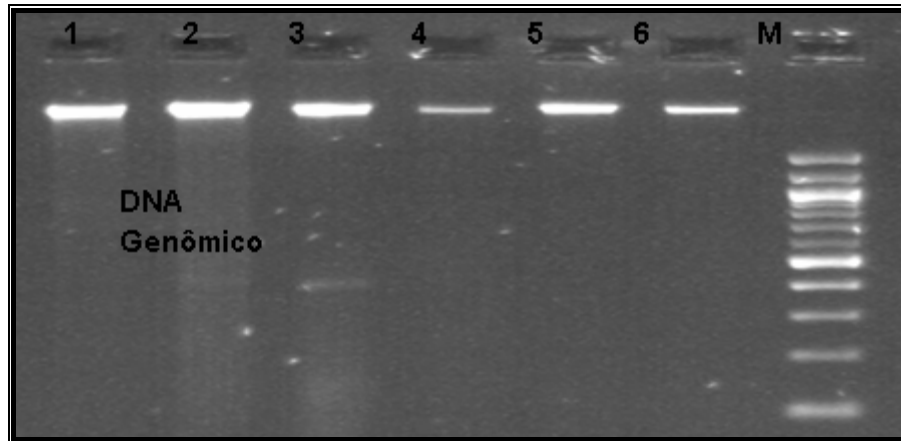
A padronização da Reação da PCR foi realizada de acordo com protocolo estabelecido, de acordo Figura 2, observa-se o produto da PCR amplificado.

Para digestão do fragmento de 349 pb amplificado foi utilizado a enzima de restrição *MunI* que refere-se a um isoesquisomêro da enzima *MfeI* a qual reconhece a seguinte seqüência : **Enzima *MfeI* ( *MunI* - Fermentas) - 5'... C↓AATTG ...3'**.

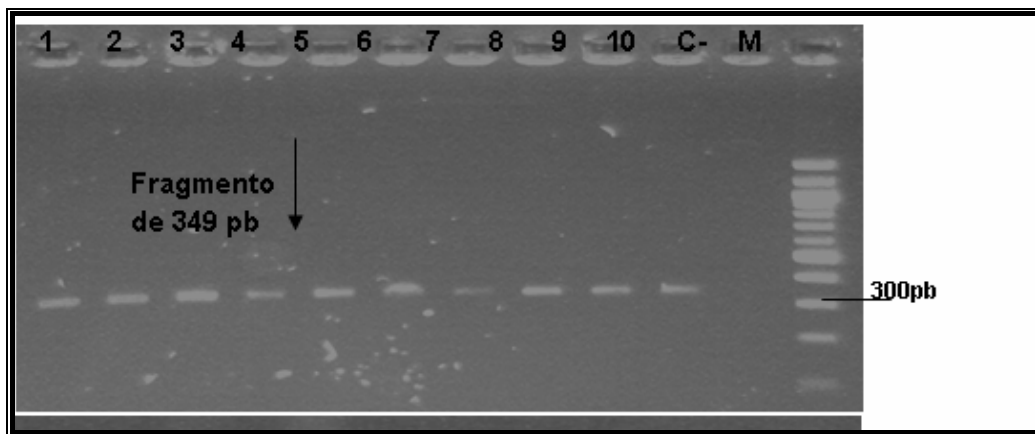
Fragmentos gerados pela restrição: T- 349pb

A- 202pb e 147pb

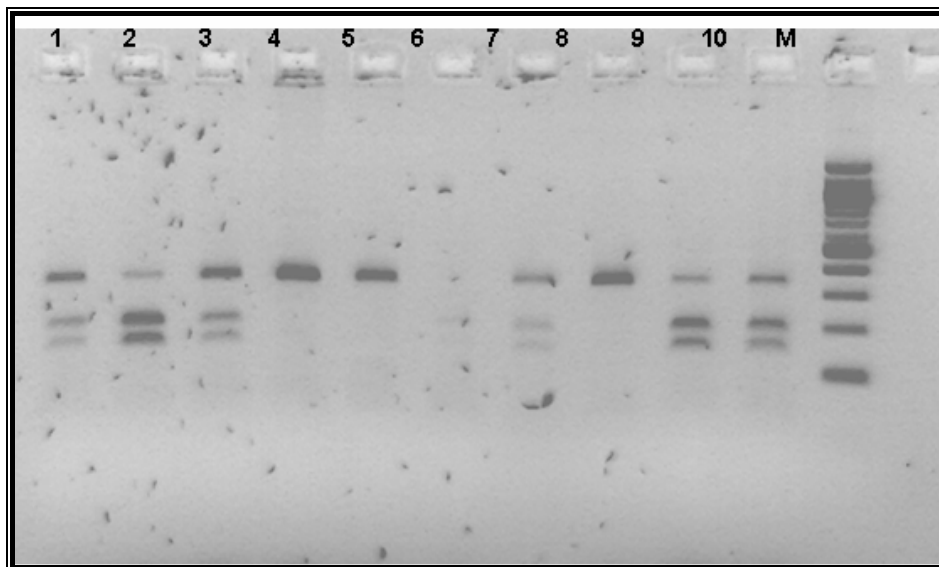
Os fragmentos são visualizados na figura 3.



**Figura 1.** Gel de agarose 2%, corado com Syber Safe, para visualização do DNA Genômico extraído de Sangue Periférico. 1-6, diferentes amostras e M, Marcador de peso molecular (100pb).



**Figura 2.** Gel de agarose 2%, corado com Syber Safe, para visualização da Amplificação de 349 pb referente ao fragmento gênico da *IL-8* no qual consta o sítio de restrição da enzima *MunI* referente a base -251. 1-10, amostras amplificadas; C-, Controle Negativo (água) e M, Marcador de peso molecular (100pb).



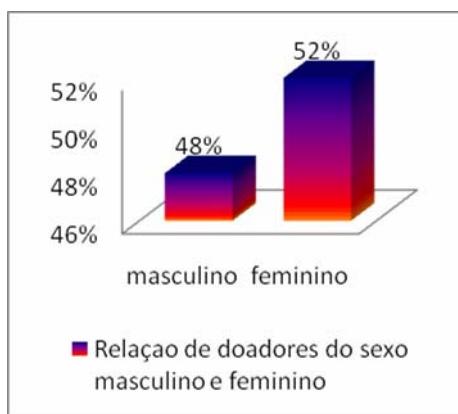
**Figura 3.** Gel de agarose 2%, corado com Syber Safe, para visualização da digestão do produto de 349 pb referente ao fragmento gênico da *IL-8* no qual consta o sítio de restrição da enzima *MunI* referente a base -251. Fragmentos gerados pela restrição: T- 349pb, A- 202pb e 147pb e TA – 147pb, 202pb e 349 pb.

Neste estudo foram coletadas 90 amostras de Sangue Periférico de Doadores Voluntários, todos alunos das Faculdades Integradas de Ourinhos, após o recolhimento do Termo de Consentimento Informado de todos os participantes da pesquisa. Dentre as 90 amostras coletadas 43 referem-se a estudantes do sexo masculino (48%) e 47 do sexo feminino (52%), conforme Gráfico 1. A idade média de todos os pesquisados foi de 23.6 anos, sendo a idade média das mulheres de 23.7anos e homens de 23.5 anos.

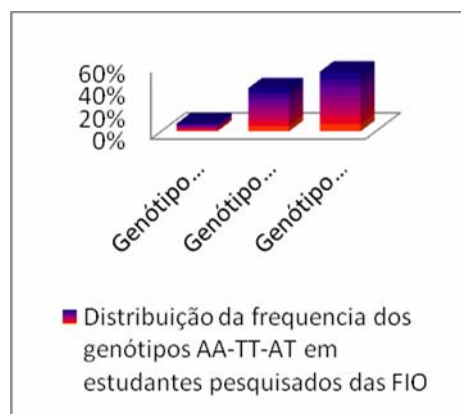
De todas as amostras coletadas, foi extraído DNA genômico, conforme Figura1, posteriormente realizado a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), de acordo com a Figura 2 e posteriormente as amostras foram genotipadas através da Técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphis), Figura 3.

Neste estudo observa-se que a frequência do genótipo AA, relacionado com a potencialização de resposta inflamatória, foi relativamente baixa (7%), no grupo estudado enquanto a maioria dos resultados compõe-se de heterozigotos (54%), conforme Figura 5.

De maneira geral não houve significativa variação na distribuição genótipo TT e AT, quando considerado o sexo dos participantes, havendo apenas uma diferença na frequência do genótipo AA maior nas mulheres, possivelmente relacionada ao maior numero de amostras do sexo feminino, visto a ausência de descrição de qualquer relação com os genótipos II-8 (base – 251AT) e o sexo do individuo na literatura, conforme Figuras 6 e 7.



**Figura 4: Relação de doadores do sexo masculino e feminino.**



**Figura 5: Distribuição da frequência dos genótipos AA-AT-TT em estudantes pesquisados das FIO.**

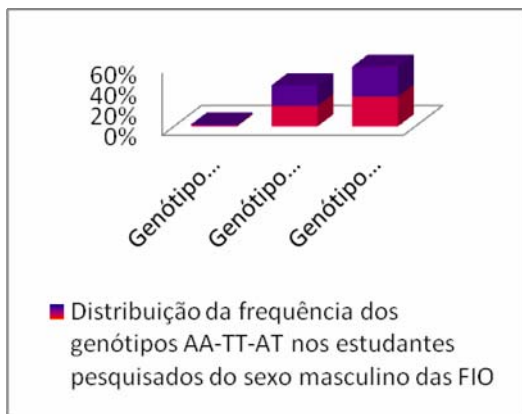


Figura 6: Distribuição da frequência dos genótipos AA-TT-AT nos estudantes pesquisados do sexo masculino das FIO.

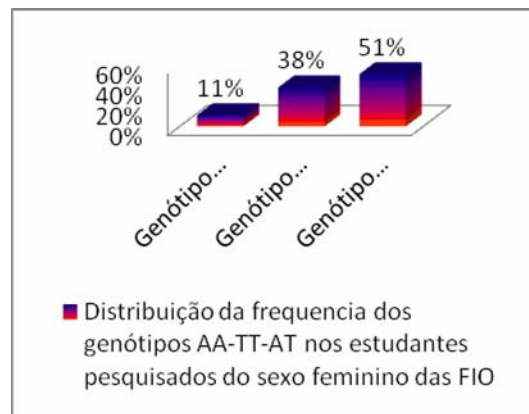


Figura 7: Distribuição da frequência dos genótipos AA-TT-AT nos estudantes pesquisados do sexo feminino das FIO.

## CONCLUSÃO

Conclui-se, com o presente estudo, que no grupo de indivíduo saudáveis a prevalência de genótipo Il-8 é de heterozigotos (AT) corroborando a associação do genótipo AA com a elevada produção e secreção dessa citocina em processos inflamatórios, entre eles os seguidos da infecção H.pylori, como observado em paciente com doenças gastroduodenais, os quais apresentam maior frequência desse genótipo.

## REFERÊNCIAS

- CORREA, P.; Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – First American cancer society Award Lecture on cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res** 1992; 52:6735-40.
- GATTI, L.L.; AGOSTINHO, JN. R.; DE LÁBIO, F.; BALBO, P.; L. C. DA S. V.. DE QUEIROZ, F., PERES, C.A.; D. BARBIERI DE ARRUDA CARDOSO SMITH, PAYÃO, S. L. M.. *Helicobacter pylori* and *cag A* and *vac A* gene status in children from Brazil with Chronic gastritis; **Clin Exp Med** 2003; 3:166-172.
- HULL, J.; THOMSON, A.; KWIATKOWSKI, D.; Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. **Thorax** 2000; 55:1023-1027.
- KIDO, S.; KITADAI, Y.; HATTORI, N.. Interleukin – 8 and vascular endothelial growth factor – prognostic factors in human gastric carcinomas?. **Eur J Cancer** 2001; 37:1482.
- KITADAI, Y.; HARUMA, K.; MEIKADA, N.. Regulation of disease – progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2735-40
- KOCH, A.E.; VALIN, M.V; WOODS, J.M.. Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin – 8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the Joint rheumatoid. **Arthritis Rheum** 2001; 44:31-40
- LEE, W.P.; IN TAI, KENG – HSIN, LAN.; ANNA FEN – YAU, LI. HOU.; – CHING, HSU. EN.; – JU LIN, YI – PING LIN, MUIN – LING SHEU, CHUNG - PIN LI, FULL – YONG CHANG, YEE CHAO, SHANG – HEW YEN AN SHOU – DONG LEE. THE –



251 A Allele of the Interleukin – 8 Promoter Is Associated With Increased Risk of Gastric Carcinoma Featuring Diffuse – Type Histopathology in Chinese Population. **Clin Cancer Res**; 11(18) -2005

NICKOLOFF, B.J.; MITRA, R.S.; VARANI, J.; DIXIT, V.M.; POLIRRINI, P.J.. Aberrant production of interleukin – 8 and thrombospondin – 1 by psoriatic Keratinocytes mediates angiogenesis. **Am J Pathol** 1994; 144: 820 – 8

OHYAUCHI, M.; IMAMATANI, A.; YONECHI, M.; ASANO, N, MIURA. A.; LIJIMA, K.; KOISE, T.; SEKINE, H.; OLHARA, S.; SHIMASEGAWA, T.; The polymorphism interleu Kin 8 – 251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. **Gut** 2000; 54:330 – 335

OMAR, E.L.; CARRIGTON, M.; CHOW, W.H.; MC COLL, K.E.; BREM, J.H.; YONG, H.A.; HERRERA, J.; LISSOWSKA, J.; YUAN, C.C.; ROTHMAN, N.; LANYON, G.; MARTIN, M.; FRAUMENI, J.F.JR.; RABKIN, C.S.; Interleukin – 1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature** 2000; 404:398-402

SARUESTANI, E.K.; ABDULHA, B.; MALIH, M.; KAMRAN L. R.; ALI – TAGHAVI, R.; SABERRIFIROOZI, M.. Association of *H. pylori cag A* and *vac A* genotypes and *IL – 8* gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. **Gut** 2006; 12 (32): 5205 – 5210

XAUBET, A.; AUGUSTIC, LUBURICH, P.. Interleukin – 8 expression in bronchoalveolar lavage cells in the evaluation of alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis – **Respir Med** 1998; 92:338-44