

Estudo soroepidemiológico da prevalência de anticorpos IgG (Imunoglobulina G) anti - *Helicobacter pylori* em estudantes das Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO

Seroepidemiological study of the prevalence of IgG (immunoglobulin G) anti - *Helicobacter pylori* in degree students at Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO

¹SILVA, G.D.B.; ² GATTI, L. L.

^{1e2}Departamento de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

O microrganismo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) parece fazer parte da patogenia da doença péptica, devido a sua identificação na mucosa do estômago e duodeno de indivíduos adultos. Estudos histológicos e de culturas de tecido reforçaram a premissa da participação do *H. pylori* na gênese da doença péptica e lesões malignas. Estes aspectos são muito bem registrados pela literatura médica. O presente trabalho tem como objetivos, caracterizar o perfil sorológico de anticorpos anti-*H. pylori* da classe IgG (Imunoglobulina G) de amostras de soro de estudantes das FIO com o objetivo de verificar a soroprevalência de anticorpos anti-*h. pylori* na população estudada. Para tanto, a técnica a ser empregada refere-se a técnica de ImmunoComb *H. Pylori* IgG (ELISA) comercial da empresa Organics. Foram analisadas 80 amostras de alunos voluntários das FIO, com 47 (59%) do sexo feminino e 33 (41%) do sexo masculino. Verificou-se que 57 (71%) amostras analisadas eram soropositivas para IgG anti-*H. pylori*, sendo 78% (37/47) do sexo feminino e 60% (20/33) do sexo masculino. Estes resultados indicam alta prevalência de anticorpos anti-*H. pylori*, predominantemente para o sexo feminino, quando comparado com as amostras do sexo masculino.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, Doença Gástrica, anti-*h. pylori*, IgG

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) appears to be part of peptic diseases pathogenesis due to your identification in mucus membrane of stomach and duodenum in adults. Histological and culture studies in tissues reinforced the premise of *H. pylori* participation in pathogenesis of peptic ulcer disease and malignant lesions. These aspects are very well recorded in the medical literature. This study aims to characterize the serological profile of anti-*H. Pylori* IgG (immunoglobulin G) of degree students samples at FIO in order to determine the seroprevalence of anti-*H. pylori* in study population. Therefore, the technique to be used refers to ImmunoComb *H. Pylori* IgG technique (ELISA) of Organics company's. Eighty samples of degree students at FIO were analyzed with 47 (59%) individuals of female sex and 33 (41%) of individuals of male sex. It was found that 57 (71%) samples were seropositive for IgG anti-*H. pylori*, with 78% (37/47) female and 60% (20/33) male. These results indicated a high prevalence of IgG anti-*H. pylori* predominantly in females compared with male samples.

Keywords: *Helicobacter pylori*, peptic diseases, anti-*h. pylori*, IgG

INTRODUÇÃO

O *Helicobacter pylori* tem sido descrito na literatura como o responsável pela gênese de gastrite, úlcera péptica e neoplasias gástricas. (ANDERSEN et al., 1998).

Descrito primeiramente por Marshal e Warren em 1983, refere-se a uma bactéria gram negativa, com forma curva, contendo de 6 a 8 flagelos arranjados em forma unipolar ou bipolar. Uma outra característica típica desta espécie é a produção abundante de uma enzima denominada urease, a qual é responsável pela degradação da uréia em amônia alcalinizando o pH gástrico. Estas características são adaptativas a sobrevivência da bactéria no estômago. (JERRIS, 1995).

Inicialmente, a busca por fatores de virulência envolvidos na patogenicidade da bactéria levou ao isolamento de uma proteína denominada citotoxina vacuolizante (VacA), de 87 kDa, a partir do sobrenadante de cultura. Esta proteína está presente no sobrenadante de 50% das cepas de *H. pylori* e foi assim denominada por induzir a vacuolização de diversas linhagens de células eucariontes, *in vitro*. (LEUNK et al., 1988).

Estudos posteriores permitiram a identificação do gene que codifica a proteína VacA em todas as cepas de *H. pylori* examinadas. (COVER et al., 1990).

Entretanto, observou-se que a proteína só é exportada para o meio de cultura em bactérias contendo alelos específicos do gene *vacA*. O polimorfismo alélico do gene em questão está presente em duas regiões, uma primeira que contém a sequência sinal (s), envolvida no transporte da toxina, podendo ocorrer os alelos s1 e s2 e uma segunda região de 600 pb da região mediana do gene (m), ocorrendo os alelos m1 e m2. A virulência da bactéria pode variar de acordo com as diferentes combinações destes alelos. (ATHERTON et al., 1997).

Estudos de Xiang et al. (1995) consistiram na separação de cepas de *H. pylori*, segundo sua patogenicidade, em dois grupos: Tipo I (virulento) e Tipo II (não virulento). Extratos de bactérias Tipo I, injetados em camundongos, induziram vacuolização, erosão, necrose e ulceração nas células epiteliais do estômago. Estes danos são os mesmos encontrados em biópsias gástricas de pacientes infectados com *H. pylori*. O mesmo não acontece com a injeção de extrato de bactérias Tipo II, nos camundongos. Além disso, os autores verificaram que as bactérias do Tipo I expressam a citotoxina vacuolizante codificada pelo gene *vacA* e a proteína denominada citotoxina associada codificada pelo gene *cagA*, enquanto que as do Tipo II só expressam *vacA*, indicando que o *cagA* também possa estar relacionado a patogenicidade das bactérias. (TELFORD et al., 1994).

O gene *cagA* encontra-se presente em 60-70% das cepas de *H. pylori* e codifica uma proteína imunodominante de alto peso molecular, 120-140 KDa, de função ainda desconhecida. (COVACCI *et al.*, 1993).

Este gene situa-se em um *locus* genômico que contém genes que potencialmente codificam o sistema de secreção tipo IV (Hacker *et al.*, 1990). Portanto, a presença desta região pode ser uma indicação de maior virulência dessa bactéria. (CENSINI *et al.*, 1996).

Outros trabalhos associam a presença do gene *cagA* a uma maior capacidade de colonização das bactérias, desenvolvimento de um processo inflamatório, com estímulo da liberação de interleucina- 8 (IL-8). A IL-8 é responsável pelo aumento da migração de neutrófilos na região da infecção. Este aumento não é suficiente para reprimir a infecção, ocorrendo desintegração de neutrófilos, liberação de óxido nítrico e radicais hidroxil. Estes são potencialmente mutagênicos induzindo danos na mucosa, proliferação de células com elevado risco de erro na síntese de DNA, perda de estruturas epiteliais, subsequente atrofia e eventual metaplasia. (CORREA, 1995; AKOPYANTS, 1998; KEATES *et al.*, 1999).

No Brasil, Queiroz *et al.* (1998) demonstraram que existe uma correlação entre a presença do gene *cagA* e a ocorrência de câncer gástrico distal. Em outro estudo Gatti *et al.* (2006) demonstraram uma associação entre a presença do gene *cagA* com um aumento do processo inflamatório em crianças.

Tanto o gene *cagA* (o qual pode ser considerado um marcador para a presença da região genômica que codifica o sistema de secreção tipo IV) quanto os alelos s1 e m1 do gene *vacA*, independentemente, estão envolvidos na maior virulência do *H.pylori*. Em favor desta hipótese verificou-se que mutantes de *H. pylori* Cag A-, Pic B- (outro gene da região genômica que codifica o sistema de secreção tipo IV) e Vac A-, testados separadamente diminuem apoptose e aumentam a viabilidade de células epiteliais gástricas. (PEEK *et al.*, 1999).

Além disso, cada um dos genes citados parece interferir em fases específicas do ciclo celular, podendo ser este um dos fatores responsáveis pela predisposição dos pacientes infectados ao desenvolvimento de câncer e outros distúrbios do ciclo celular.

Em vista da importância da infecção bacteriana no desenvolvimento de úlcera péptica, gastrite e câncer gástrico, o objetivo geral do projeto consiste em verificar através de um estudo sorológico a incidência de anticorpos anti-*H. pylori* em uma

população de estudantes das Faculdades Integradas de Ourinhos como forma de prevenção da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material biológico

Foram coletados sangue periférico de 80 alunos das Faculdades Integradas de Ourinhos, de forma aleatória, no período de Agosto e Setembro de 2011, através de punção venosa. Esse material após a coleta foi encaminhado ao laboratório de Análises Clínicas das FIO e levado à Banho Maria 37° para potencializar a coagulação e retração deste coágulo e centrifugado para obtenção do soro onde foi feito a pesquisa para detecção dos anticorpos anti-*H.pylori*, conforme técnica abaixo, descrita pelo fabricante do teste.

Procedimento Técnico para detecção de anticorpos anti-*H.pylori*:

A placa reveladora foi incubado a 37°C por um período de 20 minutos. Para cada amostra e controle foi dispensado 100 µL de diluente no microtubo; e, para cada microtubo foi adicionado 10 µL da amostra ou do Controle Positivo ou Controle Negativo.

Para a fileira A da Placa Reveladora (reação antígeno-anticorpo) foi dispensado 25 µL da amostra pré-diluída. Cada cavidade da fileira A foi homogeneizada com a ponteira da pipeta e, o pente foi colocado por 30 minutos exatos. Ao final dos 30 minutos, o pente foi colocado na fileira B (primeira lavagem), agitando-o por 10 segundos, com repetições, por um período de 2 minutos.

Na fileira C (ligação do conjugado) deixou-se o pente por 20 minutos e, posteriormente foi colocado para uma segunda lavagem (fileira D) por um período de 2 minutos. Após este período, uma terceira lavagem foi realizada (fileira E) utilizando-se a mesma técnica.

Na fileira F (reação de cor) o pente foi inserido e deixado por 10 minutos. Ao término, retirou-se o pente e foi colocado novamente na fileira E (lavagem) por 1 minuto. Após 1 minuto, retirou-se e foi deixado secar ao ar livre para a leitura visual dos resultados. Conforme figura abaixo:



Figura 1 – Resumo dos principais procedimentos do teste

RESULTADOS

Até o presente momento foram analisadas 80 amostras de alunos voluntários das FIO, sendo destes, 33 do sexo masculino (41%) e 47 do sexo feminino (59%). A idade média dos alunos envolvidos no trabalho foi de 25 anos de idade.

Quanto ao sexo, observa-se um predomínio do sexo feminino, 78% (37/47); e para o sexo masculino, 60% (20/33) – Tabela 1. Não foi encontrado, na literatura pesquisada, nenhuma associação entre a infecção pelo *H. pylori* com os sexos.

Tabela 1 - Relação *H. pylori* por faixa etária

		19 - 29	30 - 40	41 - 45	Total
Homens	Positivo	17	3	0	20
	Negativo	10	3	0	13
Mulheres	Positivo	31	2	4	37
	Negativo	10	0	0	10

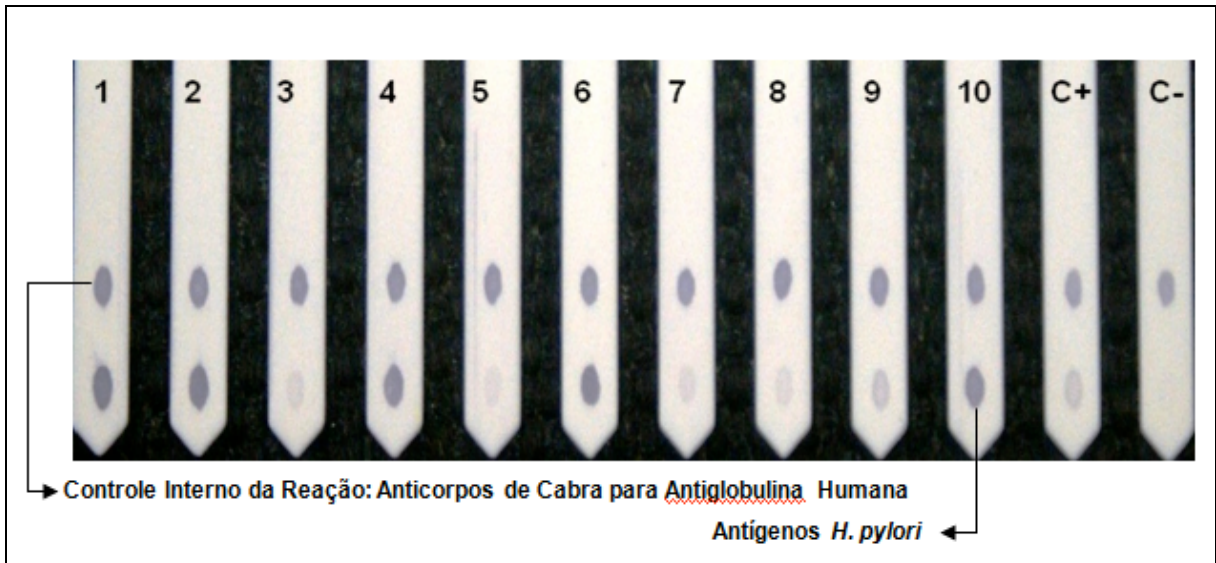


Figura 2 - Pentes sensibilizados com anticorpos de cabra (ponto superior) e antígenos *H. pylori* inativados (ponto inferior) para detecção de anticorpos IgG anti-*H. pylori* nos Soros testados, onde 1-10 referem-se a amostras de soro, C+ Controle positivo e C- Controle Negativo. Amostras 1-10 positivo. Controle Negativo (Negativo).

DISCUSSÃO

O *H. pylori* leva à morte, por ano, pelo menos 1 milhão de indivíduos. Estudos com esta bactéria tem revelado que sua principal consequência é a gastrite crônica e a gênese da úlcera péptica. (SULLIVAN et al., 1990; TEBBE, GEILEN, SCHULZKE, 1996).

Wisniewski Peura et al. (1997) relata que metade da população mundial está infectada por este microorganismo, sendo que 80% desses indivíduos permanecem sem nenhuma evidência clínica de doença, situação esta que está de acordo com os nossos resultados, uma vez que todos os indivíduos participantes da pesquisa não apresentavam sintomatologia clínica de doença gástrica.

A gênese da doença gástrica está relacionada a vários fatores, inclusive a aquisição na infância, o tipo de cepa da bactéria, a predisposição genética do hospedeiro e o meio ambiente parecem estar relacionados a sua fisiopatogenia o que torna o estudo da bactéria extremamente importante para uma melhor compreensão e prognóstico nas doenças gástricas. (WISNIEWSKI, PEURA, 1997).

Mccallion et al. (1995) descreveram que o *H. pylori* é igualmente encontrado em homens e mulheres, diferindo dos nossos resultado em que 78% das mulheres foram soropositivos, enquanto a soropositividade no sexo masculino foi 52%.

Alguns estudos revelam que a soroprevalência aumenta progressivamente com a idade. (MITCHELL *et al.*, 2003). Neste estudo, observou-se uma prevalência de positividade na faixa etária que compreende entre 19 e 29 anos (65%) em indivíduos do sexo feminino, enquanto 39% na mesma faixa etária entre indivíduos do sexo masculino. Estes dados confrontam o estudo anteriormente citado, fato este que pode ser justificado pelas amostras colhidas serem de estudantes (19-25 anos). Outros estudos podem ser desenvolvidos com mais amostras de outras faixas etárias para verificar a soroprevalência de acordo com a idade.

No presente estudo foi realizado a técnica de ImmunoComb *H. pylori* IgG (ELISA) comercial da empresa Organics. O pente contém 12 dentes para cada amostra, sendo os 2 últimos, respectivamente, Controle Positivo e Controle Negativo. A Figura 1 é o pente pronto para a leitura Na fileira superior é o controle interno da reação contendo anticorpos de cabra antiglobulina humana. Na fileira inferior, antígenos *H. pylori*.

CONCLUSÃO

Através deste estudo sorológico, observou-se uma alta prevalência de anticorpos anti-*H. pylori*, predominantemente para o sexo feminino, quando comparado com as amostras do sexo masculino, não mostrando diferença entre as idades observadas. Tais dados são de extrema importância em saúde pública visto a importância da bactéria na gênese de doenças gástricas, como gastrites, úlceras e adenocarcinoma gástrico. Outros estudos devem ser realizados para verificar a soroprevalência quanto à idade e sexo, em uma próxima etapa aumentando o número de amostras a serem testadas.

REFERÊNCIAS

AKOPYANTS, N. S. *et al.* Analyses of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori*. **Mol. Microbiol**, v. 28, p. 37-53. 1998.

ANDERSEN, L. P. *et al.* An analysis of seven different methods to diagnose *Helicobacter pylori* of infections. **Scand J Gastroenterol**, v. 33, p. 24-30. 1998.

- ATHERTTON, J. C. *et al.* Clinical and pathological importance of heterogeneity in Vac A, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 112, p. 92-99. 1997.
- CENSINI, S. *et al.* Cag A pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease – associated virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 14648-14653. 1996.
- CORREA, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Amer. J. surg. Pathol.**, v. 19(Suppl.1), p. S37-S43. 1995.
- COVACCI, A. *et al.* Molecular characterization of the 128-KDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 5791-5795. 1993.
- COVER, T. L.; DOOLEY, C. P.; BLASER, M. J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 603-610. 1990.
- GATTI, L. L. *et al.* *cagA* Positive *Helicobacter pylori* in Brazilian Children Related to Chronic Gastritis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n.4, p. 254-258. 2006.
- HACKER, J. *et al.* **Microb. Pathog.**, v. 8, p. 213-225. 1990.
- JERRIS, R. C. *Helicobacter* In: **Manual of Clinical Microbiology**. 6. ed. Washington, D.C: AMS, 1995.
- KEATES, S. *et al.* Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag+* and *cag-* *Helicobacter pylori*. **J. Immunol.**, v. 163, p. 5552-9. 1999.
- LEUNK, R. D. *et al.* Cytotoxic activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 93-99. 1988.
- MCCALLION, W. A. *et al.* Age dependent hypergastrinaemia in children with *Helicobacter pylori* gastritis – evidence of early acquisition of infection. **Gut**, v. 37, p. 35-38. 1995.
- MITCHELL, A. *et al.* Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. **Clin Microbiol.**, v. 4, p. 1326-8. 2003.
- PEEK JUNIOR, R. M. *et al.* *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of gastric epithelial cell cycle. **Cancer Res.**, v. 59, p. 6124-31. 1999.
- QUEIROZ, D. M. M. *et al.* CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. **Int. J. Cancer**, v. 78, p. 135-139. 1998.
- SULLIVAN, P. B. *et al.* *Helicobacter pylori* in Gambia children with chronic Diarrhoea and malnutrition. **Arch Dis Child**, v. 65, p. 189-91. 1990.

TEBBE, B.; GEILEN, C. C.; SCHULZKE, J. D. *Helicobacter pylori* infection and chronic urticaria. **J Am Acad Dermatol**, v. 34, p. 685-6. 1996.

TELFORD, J. L. *et al.* **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1653-1658. 1994.

WISNIEWSKI, R. M.; PEURA, D. A. *Helicobacter pylori*: beyond peptic ulcer disease. **Gastroenterologist**, v. 5, p. 295-305. 1997.

XIANG, Z. Y. *et al.* **Infect. Immun.**, v. 63, p. 94-98. 1995.