



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

**Prevalência e Associação da Infecção por *Helicobacter pylori* e do Vírus de Epstein-Barr em Adenocarcinoma Gástrico, em uma População do Norte do Brasil.**

**JEFFERSON JOSÉ SODRÉ FERRAZ**

Belém - Pará  
2012

**JEFFERSON JOSÉ SODRÉ FERRAZ**

**Prevalência e Associação da Infecção por *Helicobacter pylori* e do Vírus de Epstein-Barr em Adenocarcinoma Gástrico, em uma População do Norte do Brasil.**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano.

Co-orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

Belém - Pará  
2012

## Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

## Sistemas de Biblioteca da UFPA

Ferraz, Jefferson José Sodré , 1965-  
Prevalência e associação da infecção por  
Helicobacter pylori e do vírus de Epstein-Barr  
em adenocarcinoma gástrico, em uma população do  
norte do Brasil / Jefferson José Sodré Ferraz.  
- 2012.

Orientador: Rommel Mario Rodriguez Burbano;  
Coorientador: Juarez Antônio Simões  
Quaresma.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do  
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa  
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia  
Celular, Belém, 2012.

1. Estômago Câncer. 2. Adenocarcinoma. 3.  
Infecções por Helicobacter pylori. 4. Infecções  
por herpesviridae. I. Título.  
CDD 22. ed. 616.99433

**FOLHA DE APROVAÇÃO****Jefferson José Sodré Ferraz**

Prevalência e associação da infecção por *Helicobacter pylori* e do vírus de Epstein-Barr em adenocarcinoma gástrico, em uma população do norte do Brasil.

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular.  
Área de concentração: Biologia Celular

Aprovada em: 13 de dezembro de 2012

**Banca Examinadora**

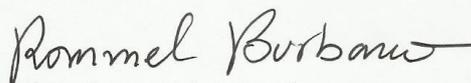
Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha  
Instituição: Instituto Federal de Educação do Pará



Prof. Dr. André Salim Khayat  
Instituição: Universidade Federal do Pará



Profª. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro  
Instituição: Universidade Federal do Pará



Presidente: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano  
Instituição: Universidade Federal do Pará

"Reze como se tudo dependesse de Deus e trabalhe como se tudo dependesse de você."

(Cardeal Shellman)

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível."

(São Francisco de Assis)

“Toda religião, arte e ciência são ramos de uma mesma árvore. Todas estas aspirações visam o enobrecimento da vida do homem, elevando-a da esfera da mera existência física e conduzindo o indivíduo para a liberdade.”

(Albert Einstein)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que é bom, e me concedeu as graças necessárias para mais esta realização.

Ao Prof. Dr. Rommel Burbano, orientador desta tese, não apenas pelo apoio recebido durante esta jornada, mas também pela amizade e pelo exemplo de competência e dedicação.

Aos meus pais Astério (*in memoriam*) e Maria de Lourdes Ferraz que me concederam seu amor e dedicação durante toda a minha vida e me iniciaram na educação.

À Cristina, Rafael, Louise, Davi, Lucas, Leonardo e Maria Eduarda (que ainda vai chegar) pelo amor, paciência, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Juarez Quaresma por toda a ajuda recebida no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Khayat pela amizade, ajuda técnica e análise crítica deste trabalho.

À colega doutoranda Aline Seabra pelo auxílio na organização dos dados e na análise estatística deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Citogenética Humana do ICB pelo trabalho realizado.

À Prof. Msc. Nelma Esteves e Prof. Msc. Graça Carvalho do Centro Universitário do Pará, por toda a colaboração nos momentos em que precisei estar ausente, em função da realização deste trabalho.

Aos pacientes, objetivo final de nosso estudo, que humildemente aceitaram participar deste trabalho.

À Polícia Militar do Pará, pelo apoio recebido no decorrer deste trabalho.

Ao Centro Universitário do Pará – CESUPA, pelo incentivo, compreensão e apoio através do programa de capacitação docente da instituição.

Aos irmãos da 2ª Comunidade Neo-catecumenal da Basílica de Nazaré que sempre rezaram por mim.

À UFPA, na pessoa dos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do ICB, pela oportunidade dada.

## RESUMO

As neoplasias gástricas são a segunda maior causa de morte por câncer e apesar das descobertas sobre a fisiopatologia das células tumorais, o câncer é considerado como, no melhor das hipóteses, minimamente controlado pela medicina moderna. O carcinoma gástrico é uma das poucas neoplasias malignas nas quais os agentes infecciosos tem um importante papel etiológico. O objetivo do presente trabalho foi pesquisar a prevalência e o grau de associação da infecção por *Helicobacter pylori* e do vírus de Epstein-Barr em adenocarcinoma gástrico, em uma população do norte do Brasil. Foram analisadas 125 amostras de adenocarcinoma gástrico que foram submetidas à técnica de PCR para detecção de *H. pylori* e da cepa *cagA* de *H. pylori*, à técnica de hibridização *in situ* para detecção do EBV e à análise histopatológica para determinação de características clínico-patológicas e epidemiológicas. Observou-se o maior acometimento de pacientes do sexo masculino (68%) e de faixa etária acima de 50 anos (78%). A prevalência encontrada para *H. pylori* foi de 88%, e foi considerada alta quando comparada a estudos anteriores na região norte. A prevalência encontrada para o EBV foi de 9,6%. Os pacientes positivos para *H. pylori-cagA*+ apresentaram um risco relativo aumentado para adenocarcinoma do tipo intestinal. A frequência para os estádios III e IV foi de 82,4%, evidenciando que o diagnóstico desta neoplasia é geralmente realizado tardiamente. Os casos positivos para *urease* apresentaram um fator de risco relativo (OR=4,231) maior que quatro vezes, para *H. pylori-cagA*+, que é a cepa mais virulenta de *H. pylori*. Não houve significância estatística para a associação entre *H. pylori* e EBV na população estudada, porém os casos positivos para EBV apresentaram 100% de positividade para *H. pylori*, sugerindo uma possível atuação sinérgica destes agentes na carcinogênese gástrica.

Palavras-chave: adenocarcinoma gástrico, *Helicobacter pylori*, EBV, HHV-4, câncer.

## ABSTRACT

Gastric neoplasias are the second leading cause of cancer-related deaths and although discoveries over physio-pathology of tumour cells, cancer is considered, to the best of our knowledge, minimally controlled by modern medicine. Gastric carcinoma is among the few malignant neoplasms in which infectious agents play an important role. The aim of the present work was to research the prevalence and the association of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in gastric adenocarcinoma in a northern population of Brazil. A hundred twenty-five samples of gastric adenocarcinoma were analyzed by PCR to detect *H. pylori* and pathogenic genotype *H. pylori-cagA+*, by *in situ* hybridization to detect EBV, and by histopathological analysis to determine epidemiologic and clinico-pathological data. It was observed a higher frequency in male patients (68%) as much as older patients (78%). Prevalence to *H. pylori* was 88%, and it was considered high when compared to early studies in northern region of Brasil. To EBV the prevalence was 9,6%. Patients *H. pylori-cagA+* showed increased relative risk to intestinal type adenocarcinoma. The case's frequency to III and IV stages of the disease was 82,4%, demonstrating that the diagnostic to this neoplasia has been done late. The *urease* positive cases presented a higher than four-fold relative risk (OR=4,231) to *H. pylori-cagA+*, the more pathogenic genotype. There wasn't statistical significance to the association between *H. pylori* and EBV in the studied population; however the EBV positive cases showed 100% positivity to *H. pylori* suggesting a possible synergistic relation of these agents in gastric carcinogenesis.

Keywords: gastric adenocarcinoma, *Helicobacter pylori*, EBV, HHV-4, cancer.

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	viii
	<b>ABSTRACT</b>	ix
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xii
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	xiii
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2	CÂNCER GÁSTRICO.....	4
1.2.1	<b>Classificação Anatômica e Histológica</b> .....	4
1.2.2	<b>Epidemiologia do Câncer Gástrico</b> .....	12
1.2.3	<b>Manifestações Clínicas</b> .....	14
1.2.4	<b>Patogênese</b> .....	15
1.2.5	<b>Prognóstico</b> .....	18
1.3	<i>HELICOBACTER PYLORI</i> E CÂNCER GÁSTRICO.....	20
1.3.1	<b>Características Biológicas da <i>H. pylori</i></b> .....	21
1.3.2	<b>Patogênese da <i>H. pylori</i> na Doença Gástrica</b> .....	23
1.3.2.1	A Ilha de Patogenicidade <i>cag</i> .....	23
1.3.2.2	O Gene <i>VacA</i> .....	27
1.3.3	<b>Resposta Inflamatória a <i>H. pylori</i></b> .....	28
1.4	O VÍRUS DE EPSTEIN-BARR E CÂNCER GÁSTRICO.....	32
1.4.1	<b>EBV: O Primeiro Vírus Tumoral Humano</b> .....	32
1.4.2	<b>Características Biológicas do EBV/HHV-4</b> .....	34
1.4.3	<b>Epidemiologia do Câncer Gástrico Associado ao EBV (EBV-GC)</b> .....	35
1.4.4	<b>Características Clínico-Patológicas e Moleculares do EBV</b> .....	37
1.4.5	<b>Diagnóstico da Infecção por EBV no Câncer Gástrico</b> .....	40
1.5	<i>HELICOBACTER PYLORI</i> E EBV EM CÂNCER GÁSTRICO.....	42
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
2.1	OBJETIVO GERAL .....	44
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
3.1	CASUÍSTICA.....	45

3.2	ANATOMIA E HISTOPATOLOGIA.....	45
3.3	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	46
<b>3.3.1</b>	<b>Investigações Sobre <i>Helicobacter pylori</i>.....</b>	<b>46</b>
3.3.1.1	Extração de DNA .....	46
3.3.1.2	Diagnóstico por PCR .....	46
3.3.1.3	Determinação da Presença do Gene <i>cagA</i> .....	47
<b>3.3.2</b>	<b>Investigação Sobre EBV.....</b>	<b>48</b>
3.3.2.1	Lâminas com Cortes Histológicos .....	48
3.3.2.2	Hibridização <i>in situ</i> .....	48
3.3.2.3	Crítérios para Análise das Lâminas .....	49
3.4	CORRELAÇÃO DE DADOS .....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO I .....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO II .....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO III .....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Anatomia do estômago.....	5
<b>Figura 2-</b>	Histologia gástrica normal.....	6
<b>Figura 3-</b>	Característica histopatológica de um adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, presença de estruturas tubulares.....	7
<b>Figura 4-</b>	Característica histopatológica de um adenocarcinoma gástrico do tipo difuso, presença de células com elevada produção de muco.....	8
<b>Figura 5-</b>	Modelo da carcinogênese gástrica de acordo com o subtipo histológico	16
<b>Figura 6-</b>	Microfotografia eletrônica da mucosa gástrica colonizada por <i>H. pylori</i>	22
<b>Figura 7-</b>	Representação do sistema de secreção do tipo IV ( <i>cag</i> -PAI) da <i>H. pylori</i> .....	24
<b>Figura 8-</b>	Visualização do EBV no citoplasma de linfoblastos derivados de linfoma de Burkitt cultivados <i>in vitro</i> .....	33
<b>Figura 9-</b>	Representação esquemática dos herpesvírus que infectam humanos, família <i>Herpesviridae</i> .....	34
<b>Figura 10-</b>	Representação esquemática do genoma do vírus de Epstein-Barr.....	38
<b>Figura 11-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico de acordo com o gênero, em uma população do norte do Brasil .....	51
<b>Figura 12-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a faixa etária, em uma população do norte do Brasil.....	52
<b>Figura 13-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a positividade para urease, em uma população do norte do Brasil.....	52
<b>Figura 14-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a positividade para EBV, em uma população do norte do Brasil.....	53
<b>Figura 15-</b>	Frequência de amostras positivas e negativas para <i>cagA</i> , em pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a classificação histológica dos tumores, em uma população do norte do Brasil.....	55
<b>Figura 16-</b>	Frequência de amostras positivas e negativas para <i>cagA</i> , em pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a positividade e a negatividade para urease, em uma população do norte do Brasil .....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Classificação do TNM patológico para o câncer gástrico.....	10
<b>Tabela 2-</b>	Grupamento por estádios para o câncer gástrico .....	11
<b>Tabela 3-</b>	Oligos utilizados na determinação dos genes <i>urease</i> e <i>cagA</i> .....	47
<b>Tabela 4-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para <i>cagA</i> , EBV e <i>urease</i> , de acordo com o gênero e a idade, em uma população do norte do Brasil.....	54
<b>Tabela 5-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para <i>cagA</i> , EBV e <i>urease</i> , de acordo com a localização anatômica das lesões, em uma população do norte do Brasil.....	55
<b>Tabela 6-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para <i>cagA</i> , EBV e <i>urease</i> , de acordo com a classificação histológica dos tumores, em uma população do norte do Brasil.....	56
<b>Tabela 7-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para <i>cagA</i> , EBV e <i>urease</i> , de acordo com o estadiamento dos tumores, em uma população do norte do Brasil.....	57
<b>Tabela 8-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para EBV e <i>urease</i> , de acordo com a positividade e a negatividade para <i>cagA</i> , em uma população do norte do Brasil.	58
<b>Tabela 9-</b>	Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para <i>urease</i> , de acordo com a positividade e negatividade para EBV, em uma população do norte do Brasil.	59

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O câncer e o seu controle continuam a apresentar grandes desafios às ciências da saúde. A doença é notadamente complexa e letal, afetando quase todas as linhagens teciduais do organismo, e apresentando uma distribuição ubiqüitária. Atualmente é a segunda causa mais comum de mortes nos Estados Unidos e é provável que se torne a mais comum em um futuro próximo. Apesar dos grandes investimentos em pesquisas sobre a doença e da profusão de descobertas sobre as mudanças genéticas, bioquímicas e funcionais nas células tumorais, o câncer é normalmente considerado como, no melhor das hipóteses, minimamente controlado pela medicina moderna, especialmente quando comparado com as outras principais doenças. De fato, no século XXI, a taxa de mortalidade por faixa etária apresentou uma discreta diminuição, quando comparada com as doenças cardíacas, cerebrovasculares e infectocontagiosas, as quais caíram aproximadamente dois terços (Varmus, 2006).

O câncer também é um problema de saúde pública e continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo. Em 2008 a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) revelou que houve 7,6 milhões de mortes por câncer. As neoplasias em geral são responsáveis por 13 % do total de mortes no mundo anualmente, sendo que a maior parte dos casos (70%) concentra-se em países em desenvolvimento, como o Brasil. Em nações industrializadas 25% da população morre de câncer a cada ano (WHO, 2012).

O câncer de próstata e mama são as neoplasias com maior incidência em homens e mulheres respectivamente, porém as neoplasias do trato gastrointestinal incluindo esôfago, estômago, fígado, cólon e pâncreas, são responsáveis por aproximadamente três milhões de novos casos e mais de dois milhões de mortes a cada ano, fazendo com que estas sejam as

neoplasias mais frequentes em todo o mundo. Contudo, a incidência destes tipos de câncer, comparadas com aqueles que não afetam o trato gastrointestinal, varia de acordo com a localização geográfica, o que é devido principalmente a variações regionais na dieta, estilo de vida, e incidência de infecções bacterianas e virais (Hamilton e Aaltonen, 2000).

O câncer gástrico (CG) está entre as neoplasias mais frequentes no trato gastrointestinal, independente do gênero ou variações regionais específicas, e apesar de um grande número de tumores do trato gastrointestinal serem curáveis através dos tratamentos cirúrgicos e combinados (cirurgia e radioquimioterapia), as neoplasias de estômago representam a segunda maior causa de mortes por câncer, revelando uma alta e persistente taxa de mortalidade. As mortes por câncer gástrico correspondem a 10,4% de todas as mortes por câncer anualmente no mundo (Carl-McGrath *et al.*, 2007).

No Brasil em 2010, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, o número total de mortes por câncer de estômago foi de 22.035, sendo 8.633 mulheres e 13.402 homens. As estimativas de incidência de câncer de estômago no Brasil demonstram que para 2012 foram previstos 20.090 casos novos, sendo 12.670 entre homens e 7.420 nas mulheres (INCA, 2012).

Na região norte, o Estado do Pará apresenta uma alta incidência deste tipo de câncer, e a capital, Belém, já esteve no décimo primeiro lugar no *ranking* de número de casos por habitantes, entre todas as cidades do mundo que detém recordes de câncer gástrico. Fatores relacionados a dieta, podem estar relacionados a alta incidência desta neoplasia no Pará, em especial o alto consumo de alimentos conservados com sal, o uso reduzido de refrigeradores e o baixo consumo de frutas e vegetais frescos (Pereira *et al.*, 2001; IARC, 2005).

Devido ao processo de transição demográfica e epidemiológica atual, se prevê um predomínio de adultos nas próximas décadas, com um consequente incremento no número de casos de câncer e uma maior pressão econômica e demanda por serviços médicos.

O câncer tem origem multifatorial e seu desenvolvimento depende da interação dos genes do organismo com o meio ambiente, inclusive quando existem cânceres de tipo hereditário, aqueles em que a genética do paciente é o principal responsável por sua evolução. A maior parte dos tumores é do tipo esporádico, isto é, se origina a partir de alterações genéticas somáticas *de novo* promovidas pela exposição a carcinógenos ambientais como os agentes infecciosos, os quais contribuem com o aparecimento de 25% de todas as neoplasias (Schottenfeld e Beebe-Dimmer, 2006).

Na carcinogênese gastrointestinal, as infecções bacterianas e virais que induzem inflamação crônica tem um papel relevante. Vários tipos de neoplasias gastrointestinais iniciam em um processo inflamatório e são precedidas por prolongados processos pré-cancerosos, que são desenvolvidos via múltiplos passos sequenciais. O estresse oxidativo ou a inflamação crônica relacionada a substâncias ou doenças, resultam na iniciação de processos regenerativos contínuos, onde a reposição de células destruídas ou danificadas através da divisão celular, oferece uma oportunidade para acumulação de danos genéticos. O aparecimento de células anormais (displasia), característico da progressão para câncer invasivo, é seguido pelo desenvolvimento de lesões pré-malignas, e depois, como resultado deste processo, há o aparecimento do carcinoma (Orlando, 2002).

O mau prognóstico da maioria destes casos de câncer é devido principalmente ao diagnóstico em estágios avançados e as poucas opções de tratamento. A diminuição na mortalidade das neoplasias do trato gastrointestinal está associada tanto ao diagnóstico precoce quanto a um maior número de alternativas terapêuticas (Carl-McGrath *et al.*, 2007).

## 1.2 CÂNCER GÁSTRICO

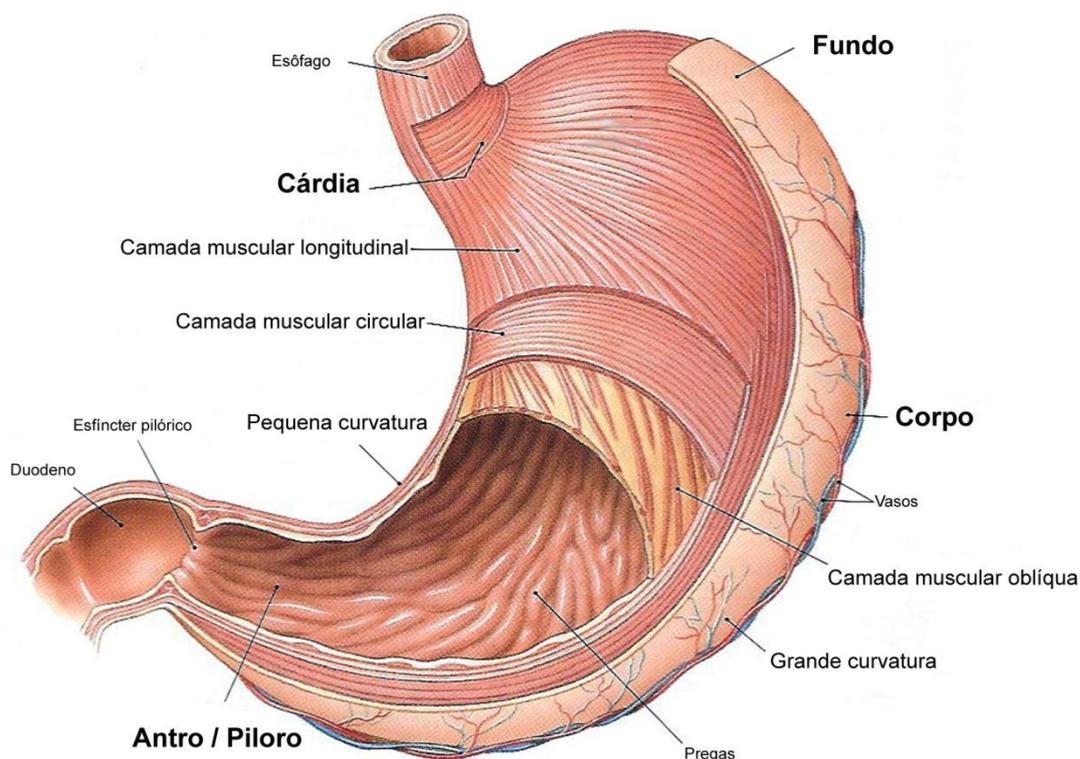
As neoplasias gástricas são uma das causas mais frequentes de morte por câncer em todo o mundo. Este tipo de câncer se desenvolve após um processo de múltiplos estágios, definidos por características histológicas e pato-fisiológicas distintas. Vários sistemas foram propostos para a classificação deste tipo de câncer nas últimas décadas. Estas classificações têm por finalidade orientar o diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes acometidos (Nobili *et al.*, 2011).

### 1.2.1 Classificação Anatômica e Histológica

Anatomicamente, o estômago é dividido em quatro regiões, a cárdia (e junção gastro-esofágica), o fundo, o corpo e o antro (e piloro), existem ainda duas outras regiões chamadas de pequena e grande curvatura, geralmente não levadas em consideração quanto à classificação tumoral (Figura 1). Histologicamente, este órgão é dividido em cinco regiões, a saber: a mucosa, a submucosa, a muscular (três camadas), a subserosa e a serosa (Figuras 1 e 2) (Sobin e Wittekind, 2004).

O câncer gástrico é uma neoplasia que pode iniciar em qualquer parte do estômago, e atingir diferentes camadas de tecidos, sendo assim, tipos diferentes de câncer podem ocorrer no estômago. O adenocarcinoma é o tumor originado na mucosa e é o tipo mais comum (Shang e Pena, 2005).

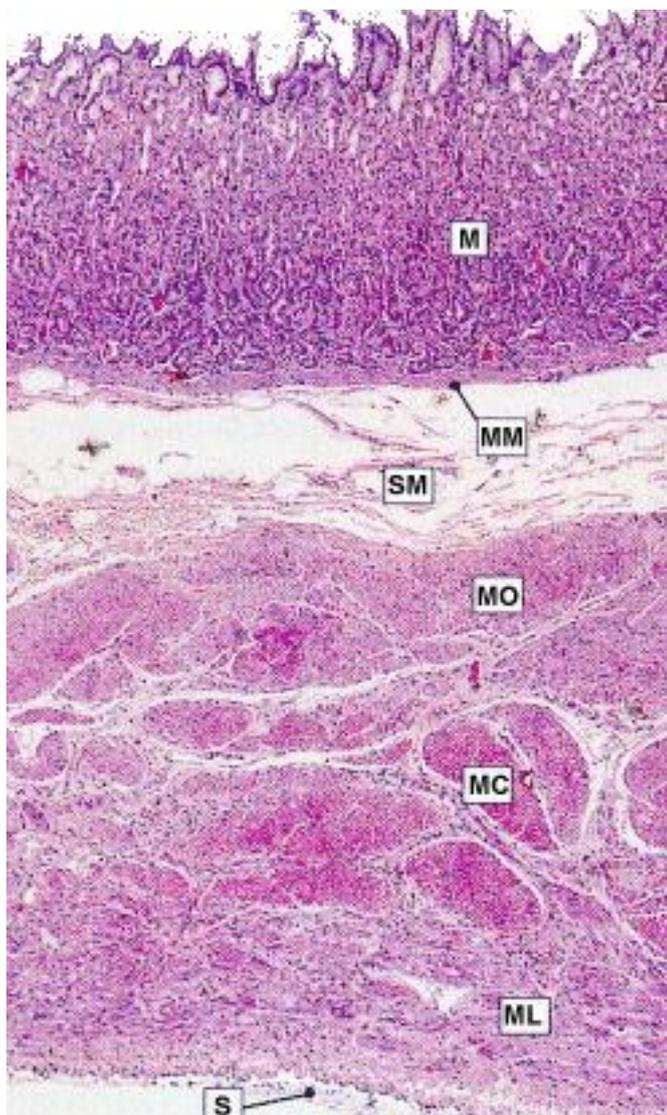
Noventa por cento dos tumores de estômago são malignos e o adenocarcinoma gástrico corresponde a 95% do total destas malignidades (Dicken *et al.*, 2005).



**Figura 1** - Anatomia do estômago (Fonte: WVC, 2006).

Os carcinomas gástricos podem ser classificados de acordo com a sua localização no estômago. Em termos de classificação, os dois principais sítios de câncer gástrico são o proximal (cárdia) e o distal (não-cárdia). Vários sistemas foram aplicados à classificação histológica dos carcinomas gástricos, incluindo a de Lauren (Lauren, 1965), a de Ming (Ming, 1977), a de Goseki (Goseki *et al.*, 1992) e a da OMS (Hamilton e Aaltonen, 2000). A significância clínica destas classificações é limitada sendo a classificação de Lauren a que apresenta maior valor prognóstico. A classificação de Lauren tem sido o sistema de maior uso, visto que o mesmo define duas entidades histológicas distintas, o carcinoma do tipo intestinal e o carcinoma do tipo difuso, os quais evidenciam

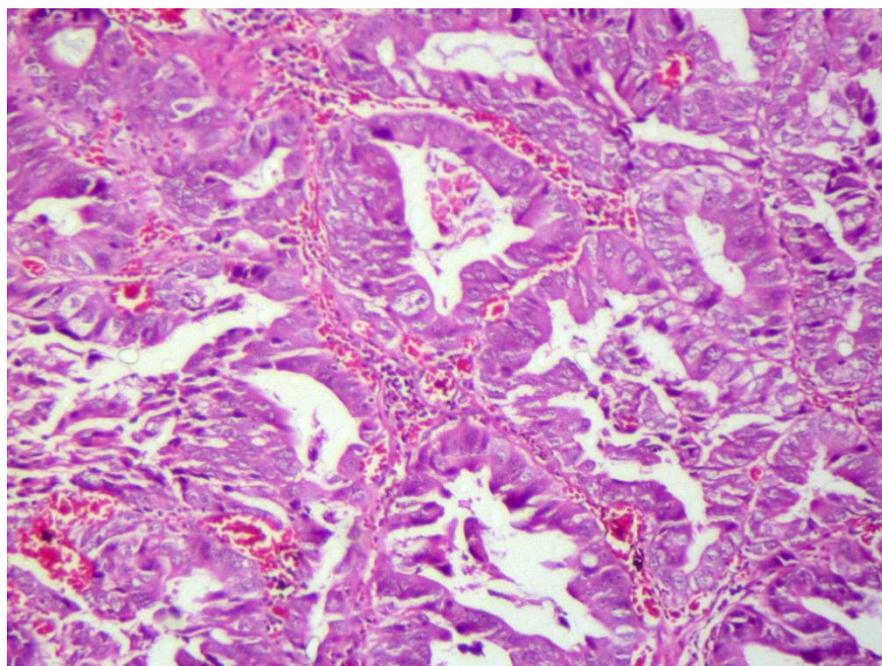
diferentes características clínicas, patológicas e epidemiológicas, mesmo nas neoplasias gástricas em estágio avançado (Satoh *et al.*, 2007).



**Figura 2** - Histologia gástrica normal: M – Mucosa (MM – muscular da mucosa); SM – Submucosa; MO, MC e ML – Musculares oblíqua, circular e longitudinal respectivamente; S – Serosa (Fonte: UL, 2012).

O tipo intestinal é mais comumente observado em pacientes mais velhos e ocorre após a gastrite atrófica multifocal. Este tipo é normalmente acompanhado por metaplasia intestinal e induz o câncer via displasia, e desta maneira a metaplasia é considerada um marcador morfológico para a avaliação do risco de câncer gástrico. O tipo intestinal exhibe um padrão de crescimento expansivo, células com núcleos grandes e irregulares, e coesão celular a ponto de permitir a formação de estruturas tubulares do tipo glandular (Figura 3) (Vannella *et al.*, 2012).

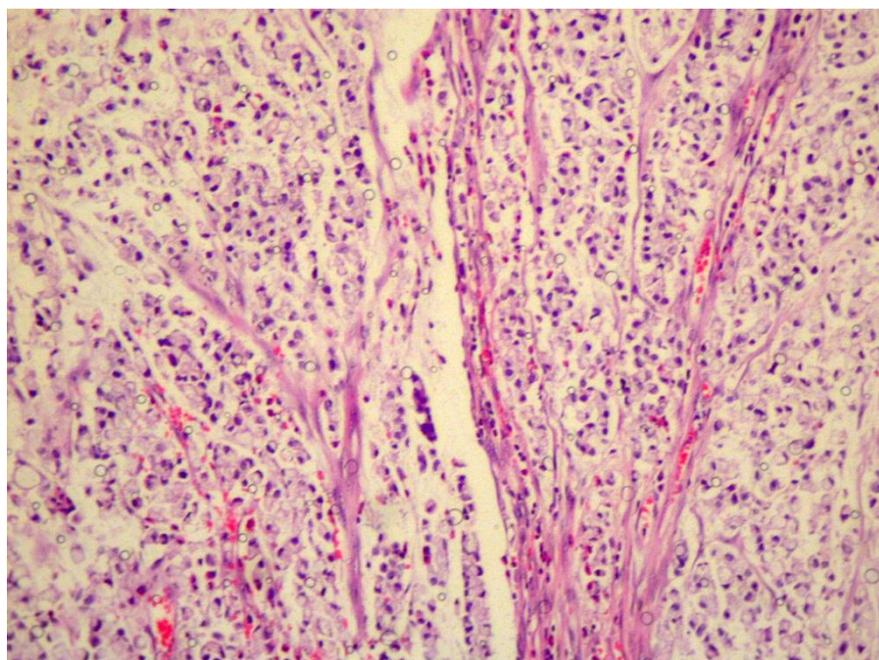
O tipo intestinal é predominante em áreas de alto risco, enquanto que o tipo difuso é mais comum em áreas de baixo risco (Hamilton e Aaltonen, 2000).



**Figura 3** - Característica histopatológica de um adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal, presença de estruturas tubulares (Adaptado de Khayat, 2007).

Diferentemente do tipo intestinal, o tipo difuso desenvolve-se tipicamente após inflamação crônica, sem passar pelas etapas intermediárias de gastrite atrófica ou metaplasia intestinal. Este tipo é constituído de pequenas células não coesas, difusamente dispersas, que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar células com núcleos periféricos devido à elevada produção de mucina (Figura 4) (Espejo e Navarrete, 2003).

O tipo difuso ocorre mais frequentemente em pacientes jovens, pode ser multifocal, nem sempre é acompanhado por metaplasia intestinal e pode ser hereditário (Carneiro, 2004).



**Figura 4** - Característica histopatológica de um adenocarcinoma gástrico do tipo difuso, presença de células com elevada produção de muco (Adaptado de Khayat, 2007).

Estes fatores clínico-patológicos sugerem que os fatores ambientais tem maior influência na carcinogênese do tipo intestinal que no tipo difuso e de modo inverso os fatores genéticos têm maior influência no câncer tipo difuso (Milne *et al.*, 2009).

O nível de estadiamento desses tumores é determinado pela classificação TNM estabelecida pelas normas da União Internacional Contra o Câncer (UICC) e é considerado a mais importante ferramenta prognóstica na prática clínica (Kwon, 2011).

A letra “T” diz respeito ao nível de crescimento tumoral, o “N” e o “M” fazem referência à disseminação para linfonodos regionais e metástases, respectivamente. Esse estadiamento pode ser clínico ou patológico, neste caso, é adicionada uma letra “p” à sigla TNM, resultando no termo pTNM. A avaliação clínica é realizada com base na extensão do tumor, por meio de exames físicos auxiliados por exames radiográficos, endoscópicos e histológicos. A avaliação do estadiamento patológico (Tabela 1) é efetuada pela análise macro e microscópica do espécime cirurgicamente obtido, visando observar a profundidade da invasão, a presença de linfonodos comprometidos e a presença de metástase à distância, sendo que pode ser adicionado à classificação clínica, a fim de reforçá-la, mas não substituí-la. Por conseguinte, o resultado do pTNM determina o estadio da doença (Tabela 2), o qual está diretamente relacionado ao relato de resultados finais e ao prognóstico do paciente (Sobin e Wittekind, 2004).

Para ser clinicamente útil, um sistema de estadiamento de câncer gástrico deve juntar as necessidades dos diversos grupos de usuários e abrigar o estadiamento tanto de cânceres distais, quanto proximais, os quais podem ser entidades biologicamente distintas (Washington, 2010).

O sistema TNM da UICC é constantemente analisado e revisto para atender as necessidades da prática clínica e laboratorial. Apresentamos nas tabelas 1 e 2, a 7ª edição deste sistema que é a mais recente.

**Tabela 1:** Classificação do TNM patológico para o câncer gástrico (Washington, 2010).

<b>pT</b>	<b>Tumor Primário</b>
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: tumor intra-epitelial sem invasão da lâmina própria
T1	Tumor que invade a lâmina própria, muscular da mucosa ou a submucosa
T1a	Tumor que invade a lâmina própria ou a muscular da mucosa
T1b	Tumor que invade a submucosa
T2	Tumor que invade a muscular própria
T3	Tumor que penetra o tecido conectivo da subserosa sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. Tumores T3 também incluem aqueles que se expandem até os ligamentos gastrocólicos ou gastrohepáticos ou até o omento maior e o menor, sem perfuração do peritônio visceral que cobre estas estruturas
T4	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral) ou estruturas adjacentes
T4a	Tumor que invade a serosa (peritônio visceral)
T4b	Tumor que invade as estruturas adjacentes como o baço, cólon transverso, fígado, diafragma, pâncreas, parede abdominal, glândulas adrenais, rim, intestino delgado e retroperitônio.
<b>pN</b>	<b>Linfonodos Regionais</b>
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 2 linfonodos regionais
N2	Metástase em 3 a 6 linfonodos regionais
N3	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
<b>pM</b>	<b>Metástase à Distância</b>
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

**Tabela 2:** Grupamento por estádios para o câncer gástrico (Washington, 2010).

<b>Estadiamento</b>	<b>Combinações TNM</b>		
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Estadio IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Estadio IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Estadio IIIB	T4b	N0 ou N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estádio IIIC	T4b	N2 ou N3	M0
	T4a	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

O câncer gástrico é definido como precoce quando o adenocarcinoma está restrito à mucosa e submucosa, independentemente de sua extensão em superfície, e a presença ou não de metástases ganglionares. Esse tipo de adenocarcinoma possui um bom prognóstico (Dekker e Op Den Orth, 1977). Porém, a maioria das neoplasias gástricas é diagnosticada na fase avançada, em função dos sintomas se manifestarem geralmente nessa fase da doença. O tumor vai ser considerado avançado quando atingir as camadas posteriores à submucosa podendo ou não apresentar metástase nos linfonodos e órgãos como o pulmão, glândulas adrenais, fígado, ossos e cavidade peritoneal (MacDonald, 1992).

### 1.2.2 Epidemiologia do Câncer Gástrico

O câncer gástrico é uma doença rara antes da idade de 40 anos, mas a sua incidência aumenta de forma constante a partir de então, e alcança um pico na sétima década de vida (Gore, 1997). Mesmo após uma ressecção curativa ou após a terapia adjuvante, aproximadamente 60% dos pacientes morrem em consequência do câncer gástrico (Macdonald *et al.*, 2001). A OMS estima que o câncer gástrico é responsável, anualmente, por mais de 988.000 novos casos, com um número de mortes variando em torno de 737.000 pacientes (IARC, 2012). O câncer gástrico se desenvolve como resultado de uma combinação de fatores ambientais associados a alterações genéticas específicas e generalizadas, e em consequência disto, acomete principalmente pacientes mais velhos que normalmente são afetados após um longo período de gastrite atrófica (Forman *et al.*, 1991).

A causa mais comum de gastrite é a infecção por *Helicobacter pylori*, a qual também está mais comumente associada ao câncer gástrico (Cavalcante *et al.*, 2012).

Mais recentemente tem sido estudada a associação entre o vírus de Epstein-Barr (EBV) e o câncer gástrico, visto que em até 10% destes tumores pode ser encontrado o EBV clonal. Estes dois agentes infecciosos foram classificados pela OMS como carcinógenos de classe I, desde 1994 (Bouvard *et al.*, 2009), cuja relação causal tem sido intensamente estudada em modelos animais (Watanabe *et al.*, 1998). O risco de infecção varia com a idade, localização geográfica e etnicidade, mas um total de 15 a 20% de pacientes infectados desenvolve úlcera gástrica ou duodenal e aproximadamente 1% desenvolve adenocarcinoma gástrico (Suerbaum e Michetti, 2002).

Também foi demonstrado que o tipo de gastrite correlaciona-se fortemente com o risco de adenocarcinoma gástrico. A presença de gastrite antro-predominante que é a forma mais comum, está associada a alto risco de desenvolvimento de úlcera péptica; enquanto que a gastrite corpo-predominante e a gastrite atrófica multifocal associam-se a um alto

risco de desenvolvimento de úlcera gástrica e subsequentemente câncer gástrico (Craanen *et al.*, 1992).

Um importante fator de risco associado ao câncer gástrico é a dieta, principalmente para o adenocarcinoma do tipo intestinal.

O consumo de sal está associado ao risco de desenvolvimento das lesões precursoras do adenocarcinoma especialmente em indivíduos predispostos geneticamente (Chen *et al.*, 2004).

Um estudo prospectivo sobre os fatores nutricionais associados ao câncer, confirmou que o consumo prolongado e excessivo de alimentos defumados, salgados e contendo nitratos, aumenta significativamente o risco de desenvolvimento do câncer de estômago (Gonzalez, 2006). O consumo destes alimentos pode levar ao aparecimento de gastrite atrófica e a uma alteração no ambiente gástrico com a geração de componentes N-nitrosos que são carcinogênicos (Jakszyn *et al.*, 2006). Em contraste, o consumo adequado de frutas e vegetais parece diminuir o risco desta neoplasia (Gonzalez, 2006).

A inter-relação da dieta com a estabilidade genômica já foi evidenciada através de estudos que demonstram que o consumo de chá verde, está associado a um menor grau de metilação dos genes, podendo funcionar como um fator de proteção epigenético no câncer gástrico (Yuasa *et al.*, 2009a).

A incidência do adenocarcinoma gástrico está diminuindo em todo o mundo, porém esta neoplasia ainda responde por 10,4% de todas as mortes por câncer. Este declínio está relacionado principalmente ao tipo intestinal. Também houve uma mudança na distribuição anatômica desta malignidade, com uma queda na incidência de câncer distal e um progressivo aumento no câncer proximal (cárdia). Há uma predominância de câncer gástrico entre indivíduos do sexo masculino, o que pode estar relacionado a fatores

hormonais. Esta predominância se relaciona principalmente ao tipo intestinal (Derakhshan *et al.*, 2009).

O aumento do índice de massa corporal (IMC) também aumenta o risco de desenvolvimento do adenocarcinoma de cardia. Considerando o aumento na incidência destes tumores e também das neoplasias do esôfago em países do ocidente, pode-se relacionar estes achados com a crescente população de obesos nestas nações (Merry *et al.*, 2007). A supressão farmacológica da acidez gástrica é ainda outro fator que aumenta o risco de adenocarcinoma gástrico distal. Outros fatores associados ao risco de câncer gástrico são o baixo status socioeconômico e pólipos gástricos (Parkin *et al.*, 2011).

### **1.2.3 Manifestações Clínicas**

O carcinoma gástrico normalmente não apresenta sintomas específicos quando se localiza superficialmente e pode ser curado por cirurgia, contudo, até 50% dos pacientes podem expressar queixas gastrointestinais não específicas como dispepsia (Gore *et al.*, 1997). Nos países ocidentais através da avaliação endoscópica, o câncer gástrico é encontrado em cerca de 1% a 2% dos pacientes com dispepsia. A falta de sintomas patognomônicos iniciais frequentemente retarda o diagnóstico. Conseqüentemente 80% a 90% de pacientes com esta neoplasia se apresenta com tumores em fase avançada ou metastáticos, com reduzida possibilidade de ressecção (Hamilton e Aaltonen, 2000).

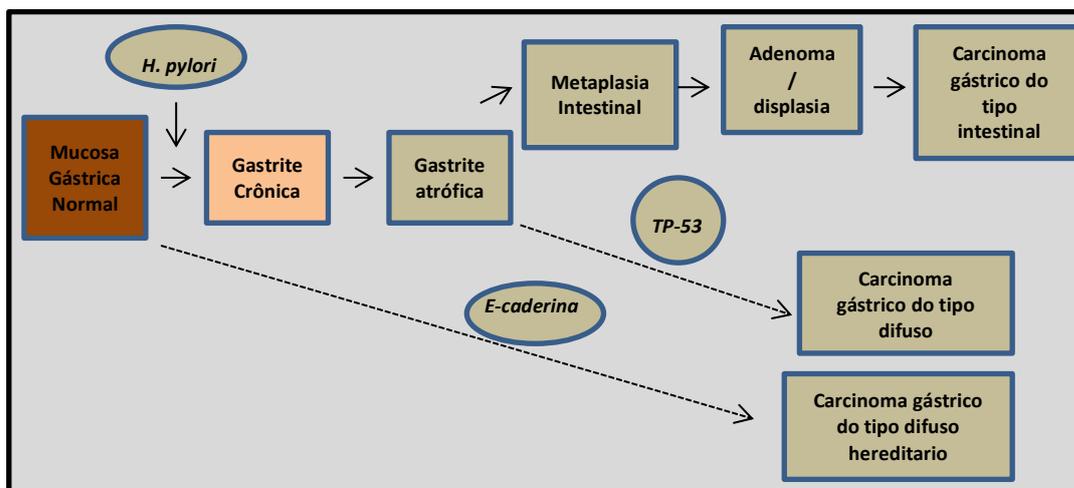
Os pacientes podem relatar anorexia e perda de peso (95%) e também dor abdominal que é vaga e insidiosa em sua natureza. Náuseas, vômito e sensação de saciedade podem ocorrer com tumores volumosos que obstruem o lúmen gastrointestinal ou com lesões infiltrativas que prejudicam a distensão estomacal. Tumores ulcerados podem gerar sangramentos que se manifestam como hematêmese, melena ou hemorragia gastrointestinal superior. O exame físico do câncer gástrico em seu estado inicial

geralmente não é instrutivo. Contudo, nos pacientes em estado avançado, pode ser observado uma massa abdominal palpável, caquexia, obstrução intestinal, ascite, hepatomegalia e edema na extremidade mais baixa do abdômen. A invasão neoplásica do peritônio pode causar o envolvimento do ovário (tumor de Krukenberg) ou pélvico (saliência de Blumer), os quais são detectados no exame retal. As metástases podem se manifestar como nódulos linfoides supraclaviculares (nódulo de Virchow), nódulos linfoides na axila esquerda (nódulo de Irish) ou através de nódulo linfoide periumbilical (Dicken *et al.*, 2005).

#### **1.2.4 Patogênese**

A patogênese do câncer gástrico envolve um processo complexo e multifatorial que é um clássico exemplo das interações entre a genética do indivíduo e os fatores ambientais como a dieta, as infecções e fatores ocupacionais. A maioria destes fatores age no microambiente da mucosa gástrica por um prolongado período de tempo (Correa, 1992). As mudanças sequenciais resultantes, que precedem o desenvolvimento de câncer invasivo na mucosa gástrica, são conhecidas como cascata pré-cancerosa. A mucosa gástrica normal é transformada pela gastrite atrófica crônica e desenvolve atrofia multifocal e metaplasia intestinal, seguida pelo aparecimento de displasia e finalmente o carcinoma invasivo (Correa, 2002).

Os mecanismos básicos precisos da carcinogênese gástrica ainda não são totalmente entendidos e variam de acordo com o tipo histológico da malignidade (Figura 5).



**Figura 5** - Modelo da carcinogênese gástrica de acordo com o subtipo histológico (adaptado de Yuasa, 2003).

Os fatores genéticos envolvidos tem um importante papel no desenvolvimento do câncer gástrico. Diversos estudos já evidenciaram que síndromes genéticas e mutações nos genes da linhagem germinativa, predisõem o indivíduo ao desenvolvimento desta malignidade. Do mesmo modo, um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas *de novo* são frequentemente encontradas no câncer gástrico, as quais provavelmente ocorrem em diferentes estágios durante o desenvolvimento da neoplasia (Ebert e Maferttheiner, 2002).

A agregação familiar no câncer gástrico é observada em aproximadamente 10% dos casos nos quais, dois ou mais parentes da mesma família são afetados. Isto, contudo, deve ser analisado com cautela devido ao fato de que, além da herança genética comum, os fatores culturais e ambientais (*e.g.* *H. pylori*, EBV, dieta) podem ser compartilhados entre os membros de uma família, e em alguns casos são difíceis de diferenciar. Entretanto, a suscetibilidade genética para desenvolver esta malignidade já foi estabelecida em alguns destes cânceres relacionados a grupos familiares (Oliveira *et al.*, 2006).

As mutações no gene *E-caderina* (CDH1) são as mais reconhecidas aberrações genéticas encontradas no câncer gástrico hereditário (Figura 5), respondendo por aproximadamente 1 a 3% dos casos de câncer. A E-caderina é uma proteína expressa predominantemente nas células epiteliais e exerce funções de adesão célula-célula e resistência a invasão. O câncer familiar associado à CDH1 segue um padrão de herança autossômica dominante, com mais de 70% de penetrância, sendo que a maioria destes cânceres é do tipo difuso, particularmente adenocarcinomas com células em anel de sinete, predominantemente observados em indivíduos jovens (Carneiro *et al.*, 2008).

Um considerável número de alterações genéticas e epigenéticas tem sido identificadas tanto em lesões pré-malignas como na própria neoplasia gástrica. Estes eventos espontâneos podem iniciar aberrações em nível molecular incluindo reativação da telomerase, ativação de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais, super-expressão de fatores de crescimento e citocinas, expressão alterada de reguladores do ciclo celular e enzimas de reparo do DNA, e aumento na instabilidade de microssatélites (Smith *et al.*, 2006). É importante salientar que os eventos genéticos e epigenéticos podem alterar a expressão de oncogenes como *c-met* e *K-ras*, de genes supressores tumorais como *p53* e *APC* (*adenomatous polyposis coli*), de genes de reparo de DNA (*hMLH1*) e de genes de moléculas de adesão celular (E-caderina e  $\gamma$ -catenina), que são fundamentais para a homeostase celular. Além do mais, estas moléculas estão consistentemente associadas com o desenvolvimento e progressão de outros tipos de câncer. Esta desregulação nestes genes provavelmente ocorre durante o curso das múltiplas etapas da carcinogênese gástrica, e é resultado de erros na replicação, mutações, ampliações, reparo defectivo de DNA, metilação aberrante, perda de heterozigidade, ou uma combinação de duas destas alterações (Hamilton e Meltzer, 2006).

Outros importantes fatores na patogênese do câncer gástrico, são as infecções pela *Helicobacter pylori* e pelo vírus de Epstein-Barr que serão discutidos em outros tópicos deste trabalho.

Uma abordagem totalmente nova e ainda em estudo, provém da teoria da célula-tronco cancerígena, segundo a qual, somente estas células podem se auto-renovar e promover o crescimento do tumor, tornando-se então alvos seletos para a terapia anticâncer (Zullo, 2012).

### **1.2.5 Prognóstico**

O prognóstico do câncer gástrico depende de vários fatores patológicos tais como o tipo macroscópico, a profundidade de invasão tecidual, a relação câncer-estroma, o padrão de crescimento histológico, o envolvimento dos linfonodos, a invasão linfática, e a localização anatômica do tumor, sendo que os principais fatores prognósticos são o estadiamento TMN, juntamente com a presença e a extensão das metástases nos linfonodos (Yokota *et al.*, 2004).

Progressos no diagnóstico e avanços nas opções de tratamento tem melhorado a sobrevida de pacientes no estágio inicial da doença. A terapia curativa para este câncer envolve tanto a terapia farmacológica quanto a remoção cirúrgica em especial a gastrectomia total ou subtotal, acompanhada de linfadenectomia. A taxa de sobrevida total em cinco anos gira em torno de 10% a 30% nos tumores gástricos removíveis cirurgicamente (Green *et al.*, 2002).

O prognóstico está correlacionado ao estadiamento sendo tanto pior, quanto maior o grau de infiltração tecidual. Os índices de sobrevida de 5 anos nos estádios Ia, Ib, II, IIIa/b, e IIIc/IV são 91%, 64%, 27%, 18% e 0% respectivamente (Lello *et al.*, 2007). O padrão de sobrevivência para pacientes na fase inicial da doença, com invasão limitada a mucosa e

submucosa é de 90-100%, comparada a 60-80% para tumores que alcançam a muscular própria, e 41-51% para tumores limitados a serosa e subserosa. Todavia o prognóstico para as neoplasias gástricas em estágio avançado é pobre, com índices de sobrevida menores que 23% e raramente excedendo os 15% (Tanaka *et al.*, 2004).

A profundidade de infiltração correlaciona-se com a presença de metástases nos linfonodos, que se forem regionais, reduzem a sobrevida de 5 anos de 90% para 70% em pacientes com câncer no estágio inicial e que apresentam invasão da submucosa (Antonioli, 1994). O *status* dos linfonodos e a proporção de linfonodos metástase-positivo/metástase-negativo, são os melhores marcadores para o prognóstico do câncer gástrico (Yokota *et al.*, 2004); e a proporção-N (metástase/linfonodos examinados) tem sido validada, em estudos multicêntricos, como um fator prognóstico independente, mesmo quando são examinados um número menor que o padrão de 15 linfonodos (Marchet *et al.*, 2007).

O índice de sobrevida de 5 anos para pacientes com metástases em 1-6 linfonodos é de 44%, caindo para 30% naqueles com 7-15 metástases linfonodais e finalizando com 11% nos pacientes com metástases em mais de 15 linfonodos. A classificação na proporção-N de 0, 1, 2 e 3 mostram índices de sobrevida de 5 anos de 83,4%, 66,3%, 46,8% e 19,0% respectivamente. Infelizmente a maioria dos pacientes à época do diagnóstico de câncer gástrico, se encontra em estágio avançado, quando geralmente, já apresentam metástases nos linfonodos (Marchet *et al.*, 2007).

Outros fatores prognósticos incluem a invasão linfática e vascular, ambas com baixos índices de sobrevida, além da classificação histológica, onde o tipo difuso está associado a um pior prognóstico (Sogun *et al.*, 1999). A identificação de expressão reduzida de E-caderina indica um mau prognóstico. Os níveis séricos de catepsina B mostram-se aumentados em pacientes com esta neoplasia gástrica correlacionando-se com

o nível de invasão tecidual e com a presença de metástases a distância, o que também está associado a sobrevida diminuída (Ebert *et al.*, 2005). A influência de outras alterações genéticas e moleculares no prognóstico deste câncer é atualmente objeto de numerosos estudos (Duarte *et al.*, 2011).

### 1.3 *HELICOBACTER PYLORI* E CÂNCER GÁSTRICO

Apesar da reconhecida relação de vírus e parasitas com doenças tumorais, o câncer gástrico é atualmente, a única malignidade reconhecidamente associada de forma causal a uma bactéria, em seres humanos (Bouvard *et al.*, 2009). A descoberta da *H. pylori* na década de 80 foi um ponto importante no entendimento da patogênese do câncer gástrico (Marshall e Warren, 1984). Este microorganismo foi isolado de biópsias gástricas de pacientes com gastrite e úlcera péptica e a primeira cultura desta bactéria foi realizada em 1982 por Marshall e Warren, que receberam o Prêmio Nobel em 2005 por esta descoberta. Atualmente a *H. pylori* está claramente instituída como um fator de risco para o câncer gástrico (Marshall, 2006).

A ligação entre *H. pylori* e úlcera péptica foi reconhecida logo após a bem sucedida cultura da bactéria, enquanto que a associação com o câncer gástrico logrou quase uma década antes que evidências credíveis fossem apresentadas (Velázquez *et al.*, 2011). A principal razão para esta demora foi a impossibilidade de demonstrar a presença de infecção ativa no tecido gástrico de pacientes com câncer. Um grande avanço neste campo veio com o reconhecimento de que a infecção crônica por *H. pylori* induz mudanças morfológicas e fisiológicas dentro do ambiente gástrico, os quais aumentam o risco de transformação maligna. Diversos estudos comprovaram que a infecção crônica por *H. pylori* provoca hipocloridria e atrofia gástrica, sendo ambas precursoras de câncer gástrico. A presença da infecção nos estágios finais da doença, não é portanto necessária ao

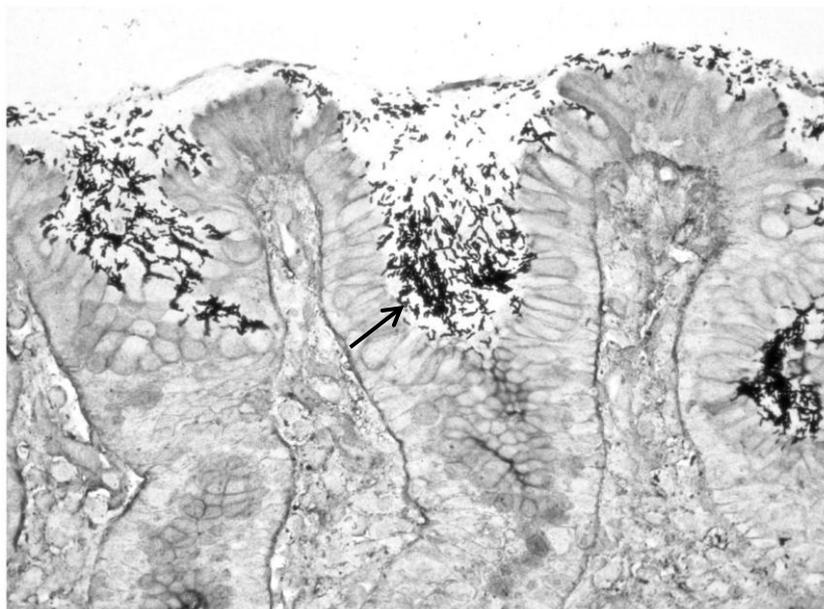
desenvolvimento de câncer, visto que, danos irreversíveis já ocorreram (Fuentes-Pananá *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Características Biológicas da *H. pylori*

O gênero *Helicobacter* consiste de pelo menos 24 espécies de bactérias encontradas no trato gastrointestinal de animais e humanos. Uma destas espécies é a *H. pylori*, um bacilo Gram-negativo, espiralado e microaerofílico que reconhecidamente infecta mais da metade da população mundial (Nagini, 2012). A *H. pylori* é normalmente contraída na infância e se não tratada, pode persistir por décadas dentro do ambiente extremo do estômago humano (Zarrilli *et al.*, 1999; Everhart, 2000). A infecção pode ser adquirida através das rotas fecal/oral ou gástrica/oral, e se não tratada com antibióticos, pode persistir por toda a vida. O microorganismo é não-invasivo, não-esporulado, medindo aproximadamente 3,5 x 0,5 micrômetros, com 4 a 6 flagelos unipolares e embainhados (Naito e Yoshikawa, 2002). Isto permite a bactéria se mover através da camada de muco do estômago e residir entre esta camada e o epitélio gástrico (Figura 6) (Segal *et al.*, 1997).

Oitenta por cento dos bacilos são de vida livre, todavia os remanescentes aderem fortemente às células subjacentes e induzem mudanças ultra-estruturais nas células epiteliais gástricas (Parsonnet *et al.*, 1994).

Apesar da *H. pylori* ser bem provida para colonizar o inóspito ambiente ácido do estômago, ela é essencialmente neutrofílica que cresce melhor em um pH entre 6,0 e 8,0 (Segal *et al.*, 1997). Para sobreviver em tais condições, a *H. pylori* possui vários fatores de virulência que a permitem colonizar o tecido gástrico e evadir-se das defesas do hospedeiro, inclusive da resposta imune.



**Figura 6** - Microfotografia eletrônica da mucosa gástrica colonizada por *H. pylori* (Adaptado de Piazuolo *et al.*, 2010).

A *H. pylori* possui a enzima urease que possibilita a hidrólise da ureia gástrica em amônia e dióxido de carbono. Isto permite à bactéria manter um pH interno e periplasmático constante, mesmo na presença de uma concentração externa de  $H^+$  muito alta. Além disso, a *H. pylori* expressa uma proteína de transporte de ureia (Ure I), com propriedades ácido-dependentes únicas, que atenua a taxa de entrada de ureia no citoplasma (Suerbaun, 2000). A combinação de um pH neutro ótimo, de urease e de um canal de ureia ácido-regulado, explica por que a *H. pylori* é única na habilidade de viver no estômago humano (Weeks *et al.*, 2000).

De fato, mutantes de *H. pylori* urease-negativas isogênicas, são incapazes de colonizar a mucosa gástrica (Eaton e Krakowka, 1994). Para conservar a energia e os recursos, a *H. pylori* procura um nicho que não desafie constantemente sua ácido-resistência, e sua maquinaria de adaptação ao meio ácido. Isto explica porque a colonização inicial é máxima na parte antral do estômago, uma região com o pH mais

elevado do que a mucosa do corpo gástrico, que produz o ácido clorídrico. Isto também explica por que a distribuição da infecção muda quando a secreção de ácido gástrico é inibida através de meios farmacológicos. Nestas circunstâncias, a *H. pylori* e a inflamação a ela associada, aumentam para envolver a, até então protegida, mucosa do corpo do estômago (Fuentes-Pananá *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Patogênese da *H. pylori* na Doença Gástrica

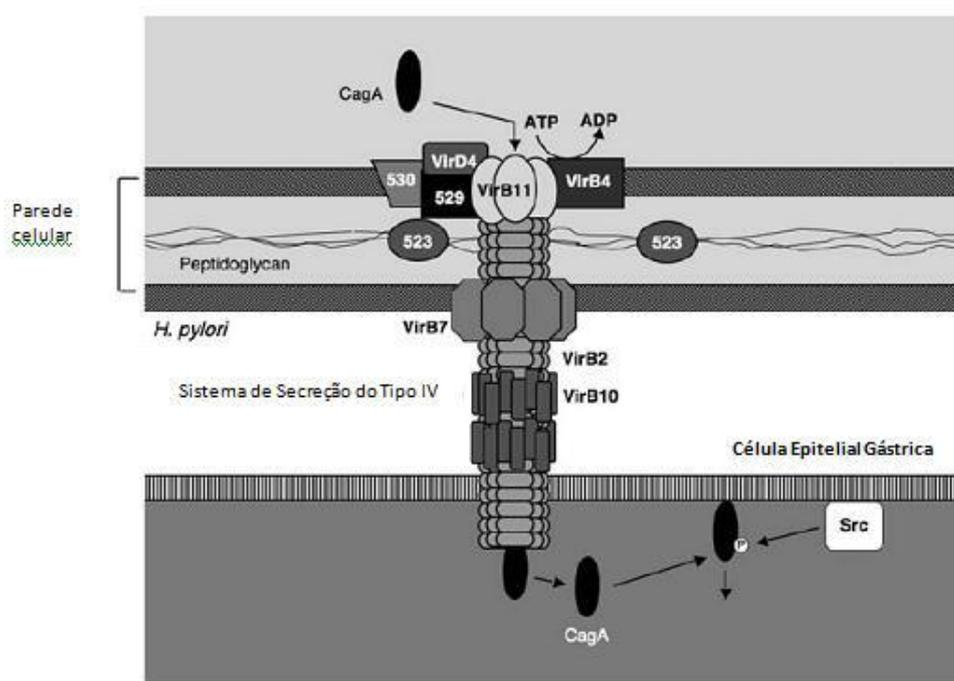
Desde o início do século XX, sabe-se que como consequência à infecção por *H. pylori*, diferentes tipos de gastrite podem ocorrer, gerando diferentes quadros clínicos. A maioria dos indivíduos infectados desenvolve pangastrite leve, uma condição que não altera adversamente a fisiologia gástrica e não está associada à doença significativa. A gastrite antro-predominante está associada a hipercloridria, o que gera um baixo risco de desenvolvimento de câncer gástrico, porém um alto risco de desenvolvimento de úlcera duodenal (Hansson *et al.*, 1996). Ao contrário a gastrite corpo-predominante, que gera hipocloridria e gastrite atrófica, apresenta um elevado risco de desenvolvimento de câncer gástrico (Uemura *et al.*, 2001).

Diversos estudos evidenciaram que diferenças genéticas têm um importante papel no resultado clínico da infecção por esta bactéria, particularmente os genes associados a virulência da *H. pylori* como o *cagA* e o *vacA*.

#### 1.3.2.1 A Ilha de Patogenicidade *cag*

A ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI) é uma região cromossômica de 40 kb do DNA bacteriano, que contem aproximadamente 31 genes. As cepas de *H. pylori* *cagA*-positivas expressam a proteína CagA codificada pelo gene *cagA* (gene A associado a citotoxina). Este gene é encontrado em 60% a 80% das cepas. Devido a sua associação

com doenças clínicas, a *cag*-PAI é agora um determinante de virulência bem caracterizado na *H. pylori*, e a proteína CagA é frequentemente usada como um indicador da presença da *cag*-PAI completa (Parsonnet *et al.*, 1997; Wroblewski *et al.*, 2010). As cepas *cagA*-positivas possuem um sistema de secreção do tipo IV, o qual se assemelha a uma agulha e injeta a proteína CagA e outras proteínas desta região cromossômica, no citosol das células epiteliais gástricas (Figura 7).



**Figura 7** - Representação do sistema de secreção do tipo IV (*cag*-PAI) da *H. pylori* que injeta a proteína CagA na célula epitelial gástrica (Adaptado de Hatakeyama, 2009).

Após ser translocada para o citoplasma, a CagA é tirosina-fosforilada e esta fosforilação ocorre em sítios glutamato-prolina-isoleucina-tirosina-alanina, específicos da região C-terminal da proteína, conhecida como motivos EPIYA. Esta fosforilação induz uma série de efeitos celulares, incluindo rearranjos do citoesqueleto, indução de

mediadores inflamatórios e indução de proteínas proliferativas e oncogênicas (Hatakeyama, 2004).

Uma vez fosforilada por membros da família de cinases Src, fosfo-CagA ativa uma tirosina-fosfatase eucariótica (SHP-2) mantendo a ativação de ERK1/2 (cinase sinal-regulada extracelular) e de cinase Src C-terminal. As interações de fosfo-CagA com cinase Src C-terminal, rapidamente ativa um sistema de retroinformação (*feedback*) negativo que inibe a sinalização por Src (Hatakeyama, 2009).

Também existem leves variações dentro dos motivos EPIYA, que resultam em quatro subtipos diferentes destes motivos: A, B, C e D (Piazuelo *et al.*, 2010). Um número aumentado de motivos EPIYA traduz-se em mais sítios de fosforilação, elevando assim os efeitos celulares induzidos por CagA. Evidenciou-se que este fenômeno aumenta consideravelmente o risco de câncer gástrico (Basso *et al.*, 2008).

Um importante mediador inflamatório induzido pela fosforilação de CagA, com consequente ativação do complexo do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), é a interleucina 8 (IL-8), um potente fator ativador e quimiotático para neutrófilos (Hatakeyama, 2004).

A *cag*-PAI também induz remodelamento da superfície celular, ativação do fator de transcrição AP-1 e expressão dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun* pela ativação da cascata da cinase ERK/MAP (cinases sinal-regulada extracelular/proteína mitógeno-ativada). As cepas de *H. pylori* que não contem a *cag*-PAI ou possuem genes *cag* mutados, não induzem estas mudanças (Stein *et al.*, 2000).

As cepas de *H. pylori* podem ser divididas em dois grupos, as cepas *cagA*-positivas e as cepas *cagA*-negativas baseados na presença/ausência do produto do gene terminal da *cag*-PAI, o CagA. As cepas *cagA*-positivas estão associadas com gastrite severa, úlcera péptica, gastrite atrófica e câncer gástrico não-cárdia, ligando assim a presença destes genes com o aumento de virulência da cepa (Parsonnet *et al.*, 1997). Contudo, deve ser

observado que nem todos os isolados *cagA*-positivos contem todos os genes de *cag*-PAI. A infecção com cepas que expressam CagA também está associada com taxa de apoptose reduzida enquanto que, as cepas CagA-negativas, com apoptose elevada. Isto evidencia portanto, que a CagA pode agir através da inibição da morte celular programada no epitélio gástrico (Kuck *et al.*, 2001).

A CagA é uma das mais estudadas proteínas da *H. pylori*, e atualmente é a única proteína efetora conhecida, que é translocada pelo sistema de secreção *cag* do tipo IV. Estudos em modelos animais e de cultura de células mostraram a importância da CagA na patogênese da *H. pylori* e destacaram as diversas funções celulares nas quais a CagA pode interferir. A geração de camundongos transgênicos que expressam CagA, tem estabelecido evidências diretas de uma relação causal entre a CagA e a oncogênese, através da demonstração de que a expressão transgênica de CagA leva a proliferação celular no epitélio gástrico e ao carcinoma. Estas mudanças não foram observadas em camundongos que expressam CagA resistente a fosforilação (Ohnishi *et al.*, 2008).

Existem fortes evidências de que CagA funciona como uma oncoproteína em mamíferos. Contudo, os modelos experimentais disponíveis atualmente, não fornecem todas as respostas. Frequentemente, modelos animais e de culturas de células fornecem informações conflitantes, e as mudanças patológicas relatadas para camundongos transgênicos CagA, ocorreram na ausência de inflamação, o que está em franco contraste com o que é observado em humanos (Ohnishi *et al.*, 2008).

Além de CagA, o sistema de secreção *cag* pode também introduzir, na célula do hospedeiro, componentes do peptidoglicano da *H. pylori*. O peptidoglicano interage com uma molécula de reconhecimento intracelular, o conhecido “domínio de oligomerização de união a nucleotídeos” (Nod1), que atua como um sensor para os componentes do peptidoglicano originado de bactérias Gram-negativas. A interação do peptidoglicano de

*H. pylori* com Nod1 leva a ativação de respostas pró-inflamatórias dependentes de NF- $\kappa$ B, como a secreção de IL-8 (Viala *et al.*, 2004). O estudo de Watanabe *et al.* (2010), revelou que a detecção intracelular de componentes do peptidoglicano de *H. pylori*, dispara uma cascata de sinalização intracelular, que culmina com a produção de interferon do tipo I (INF-I).

Somente um pequeno número de indivíduos infectados por *H. pylori* CagA-positivos desenvolvem câncer gástrico. Muito ainda precisa ser entendido sobre as circunstâncias todas que, conjuntamente contribuem, para permitir que a CagA inicie a carcinogênese (Murata-Kamiya *et al.*, 2010).

#### 1.3.2.2 O Gene *VacA*

O gene *VacA* codifica a expressão da citotoxina vacuolizante *VacA*, a qual induz a formação de vacúolos em células eucarióticas e estimula a apoptose nas células epiteliais (Kuck *et al.*, 2001). A toxina se insere na membrana da célula epitelial, formando um canal voltagem-dependente, através do qual o bicarbonato e ânions orgânicos podem ser liberados. Ao contrário da *cag*-PAI, todas as cepas de *H. pylori* possuem o gene *VacA*, contudo somente cerca de 50% das cepas expressam a proteína *VacA*. As diferenças na expressão são devidas a variação na sequência gênica. Humanos infectados com as cepas que expressam *VacA* apresentam um grau maior de gastrite, quando comparados com a infecção pelas cepas que não expressam. A infecção por *H. pylori* é invariavelmente associada com elevada proliferação das células epiteliais gástricas, o que é consequência do dano ao tecido epitelial (Rhead *et al.*, 2007).

Outros importantes fatores de virulência da *H. pylori* são os genes *babA* e *iceA*. O gene *babA* codifica a proteína da membrana externa BabA, que se liga ao antígeno sanguíneo Lewis B fucosilado, nas células gástricas. As cepas que expressam BabA

aderem mais fortemente as células epiteliais gástricas e existem evidências de que a expressão de BabA pode influenciar na gravidade da doença. As cepas de *H. pylori* que possuem *babA*, *vacA* e *cagA*, apresentam o maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico (Amedei *et al.*, 2006). Um fator de virulência putativo adicional é o gene “*induced by contact with epithelium*”- *iceA* (induzido por contato com epitélio), que apresenta duas variantes *iceA1* e *iceA2*. A expressão de *iceA1* é estimulada pelo contato da *H. pylori* com as células do epitélio gástrico humano, e em algumas populações está associada com o aparecimento de úlcera péptica (Peek *et al.*, 1998).

### **1.3.3 Resposta Inflamatória a *H. pylori***

A resposta inflamatória a agentes infecciosos se caracteriza pela expressão local de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, as quais regulam o recrutamento sequencial de leucócitos e estimulam fibroblastos e células endoteliais a dividir-se e produzir componentes de remodelação de tecido e neovascularização. Esta reação regula, em particular, a via NF- $\kappa$ B que ativa a transcrição de fatores de crescimento, genes anti-apoptóticos e outras proteínas como ciclo-oxigenase-2 (COX-2), sintetase óxido nítrico induzível (iNOS), citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas e metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) (Li e Verma, 2002).

Em condições normais uma reação inflamatória se autolimita através da diminuição de fatores pró-inflamatórios e incremento de fatores anti-inflamatórios. As células imunes sofrem apoptose e são fagocitadas e cessam as condições vasculares que permitem sua ação. A permanência dos leucócitos é uma das principais características da inflamação crônica (Lawrence *et al.*, 2002).

A inflamação inicia com o reconhecimento de ligantes por células do sistema imune inato com a utilização de receptores localizados na superfície celular, em compartimentos

intracelulares ou secretados na circulação. Os mais importantes são os receptores tipo Toll (TLR) e os NOD (Fritz *et al.*, 2006)

Os NOD são receptores citoplasmáticos e sua ativação se inicia quando peptidoglicanos internalizados de microorganismos são reconhecidos. Esta reação inicia a ativação de NF- $\kappa$ B, que por sua vez, induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Delbridge e O’Riordan, 2007).

Os TLR são proteínas de membrana do tipo I com um domínio extracelular que reconhece os ligantes, e um domínio intracelular que é transdutor de sinais. Estes receptores são proteínas muito semelhantes entre si, que se expressam em células do sistema imune e células epiteliais, sendo que em humanos foram identificadas 11 tipos (TLR1 a TLR11) (Akira *et al.*, 2006). As células epiteliais do estômago expressam TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 (Uno *et al.*, 2007). Entre as principais funções destes receptores estão a ativação da reação inflamatória e a indução da apoptose. Estes receptores reconhecem algumas estruturas invariáveis de microorganismos, as chamadas PAMP (padrões moleculares associados a patógenos), como polissacárides, proteínas e ácidos nucleicos. Também se ativam através de ligantes endógenos como proteínas do choque térmico. Os ligantes endógenos proporcionam vigilância imunitária nos sítios de inflamação e funcionam como sinais de perigo. A ativação gerada por estes ligantes favorece a inflamação crônica (Montero Vega e Andrés Martín, 2008).

A interação entre os PAMP e os TLR produz a ativação de células inflamatórias, com função de eliminar os agentes infecciosos. Pode acontecer uma eliminação inadequada do patógeno com uma persistência dos sinais pró-inflamatórios, acrescida de disfunções nos mecanismos antiinflamatórios, o que pode levar a um estado de inflamação crônica e com ele o desenvolvimento e progressão do câncer (Han e Ulevitch, 2005).

A infecção por *H. pylori* induz, na mucosa gástrica, infiltração por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos T e B, além de estimular a secreção de IL-8. Também podem ser detectadas na mucosa gástrica uma elevada concentração de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 e interferon gama (INF- $\gamma$ ). Esta resposta provoca mudanças importantes na fisiologia do estômago através do dano celular direto ou através da regulação da proliferação celular e da apoptose. Os neutrófilos e macrófagos liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que podem induzir mudanças irreversíveis no genoma das células da mucosa gástrica. A concentração destas substâncias diminui quando se elimina a infecção (Ando *et al.*, 2006). A infecção crônica com *H. pylori* incrementa a expressão de receptores tipo Toll 4 (TLR4) e de proteína diferencial mielóide 2 (MD-2) nas células epiteliais gástricas, e o lipopolissacáride (LPS) da bactéria aumenta a ativação de NF- $\kappa$ B (Ishihara *et al.*, 2004). O TLR4 se expressa na zona apical e basolateral das células epiteliais gástricas por ocasião da gastrite e tem uma distribuição homogênea e difusa durante a transformação celular no câncer; isto se expressa de maneira notória nas células tumorais do carcinoma gástrico (Schmausser *et al.*, 2005). É possível que a expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da prostaglandina E2 (PGE2) no câncer gástrico em indivíduos infectados com *H. pylori*, se relacione com a sinalização de TLR4 (Sung *et al.*, 2000), já que em câncer de cólon sua expressão regula este receptor (Fukata *et al.*, 2005). Ademais TLR2 e TLR9 interferem na sobreexpressão de COX-2 através da ativação de Src e NF- $\kappa$ B na mucosa infectada com *H. pylori*. TLR2, TLR9 e COX-2 também favorecem a invasão e a angiogênese das células gástricas (Chang *et al.*, 2005).

A infecção por *H. pylori* induz predominantemente uma resposta imune polarizada para Th1, que é ineficaz em eliminar a infecção bacteriana. A magnitude desta resposta inflamatória é grandemente influenciada por fatores genéticos do hospedeiro e da bactéria.

Na ausência de tratamento a infecção persiste por toda a vida no hospedeiro (Wilson e Crabtree, 2007).

Polimorfismos funcionais em genes que codificam importantes citocinas da resposta do hospedeiro contra *H. pylori*, podem aumentar a expressão das mesmas, o que potencia a resposta inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são mediadores já estabelecidos da resposta inflamatória induzida por *H. pylori*, pois ambas são potentes inibidoras da secreção de ácido gástrico, particularmente a IL-1 $\beta$  (Beales e calam, 1998). Polimorfismos nos genes IL-1B, ILRN e TNF-A que codificam a IL-1 $\beta$ , o receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) e o TNF- $\alpha$  respectivamente, tem sido associados com um maior risco de câncer gástrico e com algumas lesões gástricas pré-neoplásicas (Alpizar-Alpizar *et al.*, 2005). Expressão elevada de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e inibição de IL-1Ra pode ter influencia tanto na fisiologia gástrica quanto na resposta imune contra *H. pylori*, o que aumenta o risco de desenvolvimento de câncer gástrico. Também foi demonstrado que portadores de certos genótipos com polimorfismos em IL-1B e IL-RN, quando infectados com cepas específicas de *H. pylori*, podem apresentar um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasia gástrica (Figueiredo *et al.*, 2002).

A IL-8 é um dos mediadores centrais da resposta imune contra *H. pylori*. Esta quimiocina tem um papel importante na ativação e na migração de linfócitos e neutrófilos, amplificando assim a resposta inflamatória (Wilson e Crabtree, 2007). Propriedades pró-angiogênicas também foram identificadas para a IL-8. Vários polimorfismos de base única (SNPs) encontrados no gene parecem aumentar os níveis de IL-8 no sangue e um destes SNPs foi associado a um risco elevado de desenvolvimento de gastrite atrófica, úlcera gástrica e câncer gástrico. A superexpressão de IL-8 aumenta não somente a resposta inflamatória contra *H. pylori*, mas também promove a progressão tumoral devido o seu potencial pró-angiogênico (Ohyauchi *et al.*, 2005).

Outra importante citocina imunorregulatória é a IL-10, que modula a resposta inflamatória através da inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Vários polimorfismos localizados na região promotora do gene da IL-10, conferem uma expressão diferencial desta proteína, e alguns destes polimorfismos também foram associados com um risco aumentado de desenvolvimento de câncer gástrico e lesões gástricas pré-cancerosas. Curiosamente a combinação de genótipos de polimorfismos nos genes IL-1B, TNF-A e IL-10, aumenta em 27 vezes o risco de desenvolvimento de câncer gástrico. A inibição da expressão de IL-10 pode resultar em controle diminuído sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias. Isto leva a uma resposta inflamatória excessiva que é associada a um alto risco de desenvolvimento desta malignidade (Lu *et al.*, 2005).

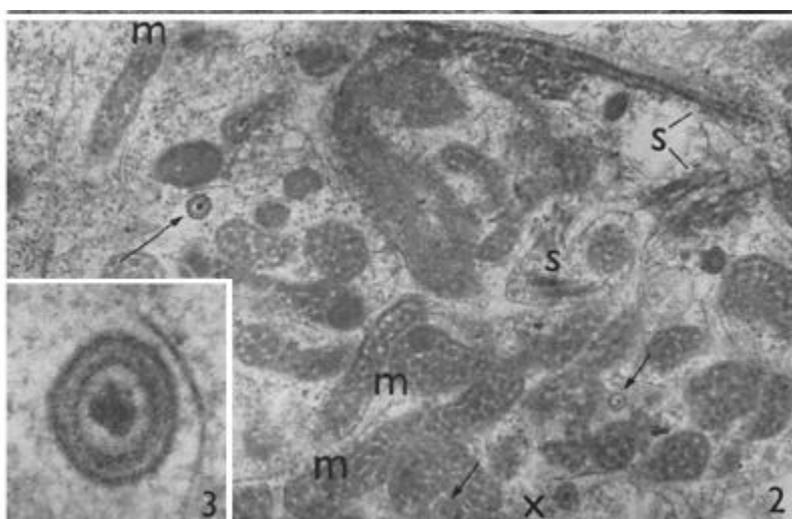
#### 1.4 VÍRUS DE EPSTEIN-BARR (HHV-4) E CÂNCER GÁSTRICO

##### 1.4.1 EBV: O Primeiro Vírus Tumoral Humano

Durante a década de 1960 a crença geral no conceito de que vírus poderiam causar câncer em animais, gerou um grande interesse na identificação de vírus associados à malignidades em humanos. Várias tentativas de isolamento de vírus tumorais não obtiveram, no entanto, sucesso algum. Contudo a questão seria em breve solucionada. Na década de 1950, Denis Burkitt, um cirurgião britânico trabalhando na África oriental, foi o primeiro a descrever um novo tumor em crianças, agora conhecido como linfoma de Burkitt (Burkitt, 1962). Curiosamente, casos desta doença, que é um câncer de células B que normalmente produz anticorpos, seguiam um padrão de ocorrência do cinturão de malária africano. Denis Burkitt então suspeitou que um vírus, talvez transmitido por um vetor artrópode, poderia ser o agente etiológico do linfoma, baseado na expectativa de que vírus poderiam promover alguns cânceres humanos, isto aliado à já conhecida transmissão

por mosquitos, não somente do parasita da malária, mas também de um numeroso grupo de vírus (*i.e.* arbovírus).

Esta nova idéia chamou a atenção dos virologistas e, em 1965, Tony Epstein, Yvone Barr e colaboradores conseguiram estabelecer linhagens celulares derivadas de linfoma de Burkitt e, visualizar por microscopia eletrônica, partículas semelhantes a herpesvírus (Figura 8), numa pequena percentagem destas células (Epstein *et al.*, 1965).

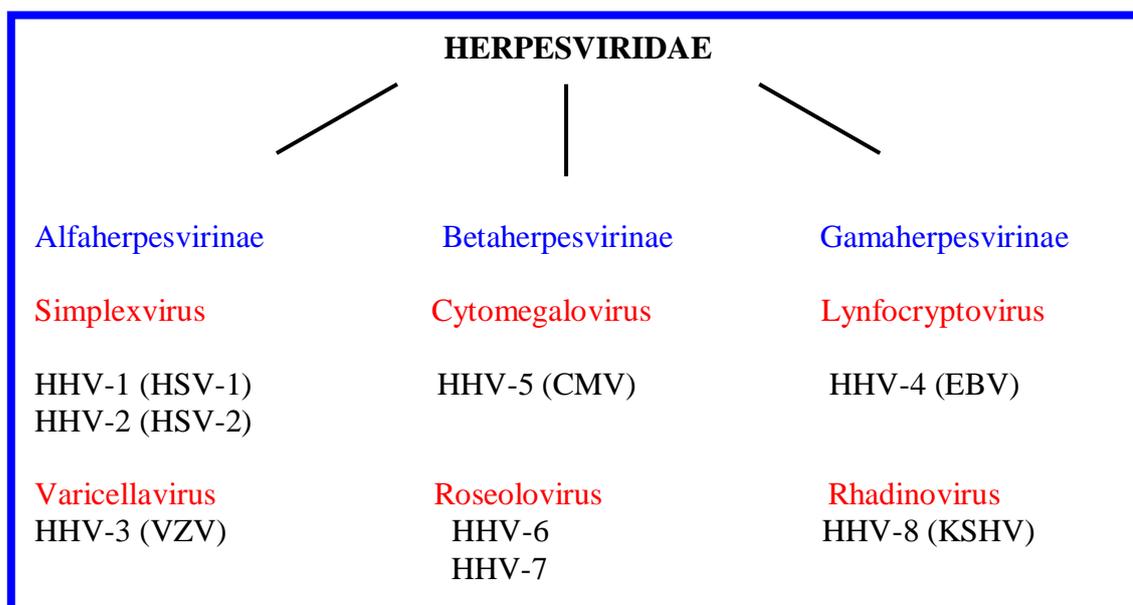


**Figura 8** - Visualização do EBV no citoplasma de linfoblastos derivados de linfoma de Burkitt cultivados *in vitro* (Adaptado de Epstein *et al.*, 1965).

Ampliando esta descoberta, que foi um marco na história da Virologia, Werner e Gertrude Henle provaram que este vírus era biológica e antígenicamente distinto de outros herpesvírus humanos conhecidos (Henle e Henle, 1966). Este novo vírus foi chamado de Vírus de Epstein-Barr ou EBV.

### 1.4.2 Características Biológicas do EBV/HHV-4

O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus classificou os herpesvírus em três subfamílias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae*, de acordo com suas propriedades biológicas (Figura 09). Atualmente, existem cerca de 70 herpesvírus descritos e com ampla disseminação na natureza; destes, oito infectam humanos (ICTV, 2011).



**Figura 9** - Representação esquemática dos herpesvírus que infectam humanos, família *Herpesviridae*: subfamílias em azul, gêneros em vermelho e abreviação das oito espécies em preto (Adaptado de Geraminejad *et al.*, 2002).

O EBV pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae* e é o protótipo do gênero *Lynfocryptovirus*. Foi o primeiro vírus oncogênico humano descoberto, sendo o único do gênero a infectar humanos (Kieff *et al.*, 1982; Javier e Butel,

2008). Possui ultraestrutura comum aos herpesvírus, apresentando regiões de DNA similares a dois Gamaherpesvírus: KSHV (HHV-8) e o Herpes Vírus Saimiri (HVS), ambos com potencial oncogênico (Hsieh *et al.*, 1999). O EBV apresenta o cerne constituído de DNA dupla fita com cerca de 172Kpb circundado por um capsídio icosadeltaédrico. O capsídio é formado por 162 capsômeros e revestido por um envoltório glicoproteico (Connolly *et al.*, 2011).

A entrada do EBV nas células B é iniciada com a ligação da proteína gp350 ao receptor do complemento do tipo 2 (CR2) que também é denominado CD21. Contudo, a expressão de CD21 no epitélio gástrico é muito pequena ou inexistente. Considera-se portanto, que a entrada do vírus na célula epitelial ocorre principalmente através de contato célula a célula entre linfócitos infectados e a célula gástrica (Imai *et al.*, 1998).

### **1.4.3 Epidemiologia do Câncer Gástrico Associado ao EBV (EBV-GC)**

O EBV é conhecido por seu potencial oncogênico e está implicado na etiologia de várias desordens linfoproliferativas como mononucleose infecciosa, alguns tipos de linfomas de células B como o linfoma de Burkitt e o linfoma de Hodgkin, e algumas neoplasias epiteliais incluindo o carcinoma de nasofaringe indiferenciado. Em 1990, Burke *et al.*, foram os primeiros a relatar a detecção do genoma de EBV em carcinoma linfoepitelial que corresponde a aproximadamente 1% dos carcinomas gástricos. Estudos posteriores nos anos 90, revelaram que os casos de carcinoma linfoepitelial se mostravam em sua maioria, positivos para o genoma do EBV, através do uso de uma nova técnica, a hibridização *in situ*, que detectava a expressão de pequenos RNAs codificados pelo EBV (EBERs). No ano de 1992, descobriu-se que o envolvimento do EBV nas malignidades gástricas não era restrito ao carcinoma linfoepitelial, conforme demonstrado pelo estudo de

Shibata e Weiss, que relataram a expressão de EBERs em 16% dos adenocarcinomas gástricos em casos da América do Norte (Shibata e Weiss, 1992).

O EBV é amplamente distribuído no mundo, sendo estimado que mais de 90% da população adulta está infectada e que a maioria desses indivíduos transmite intermitentemente esse vírus. A transmissão é mediada pela saliva, possivelmente por perdigotos. Inicialmente, o EBV infecta células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares (Tsuchiya, 2002). Posteriormente, os vírus disseminam-se para os tecidos linfóides subjacentes infectando o linfócito B, que representa o principal reservatório viral. Durante a infecção primária, os vírus presentes na saliva podem também penetrar nas criptas de estruturas linfoepiteliais, atravessando uma fina camada superficial de células epiteliais para alcançar diretamente os linfócitos subjacentes (Thorley-Lawson, 2001). O destino das células infectadas pelo EBV (ciclo lítico ou latência) depende da natureza do tecido envolvido. Enquanto que a replicação lítica e a produção de partículas virais acontecem nas células epiteliais da orofaringe, nas células B de memória, o vírus estabelece uma infecção persistente por toda a vida. Ocasionalmente uma pequena percentagem de células B infectadas com vírus latente, pode iniciar um ciclo lítico espontâneo (Odumade *et al.*, 2011). No carcinoma gástrico associado ao EBV (EBV-GC) se observa uma predominância do sexo masculino e em algumas nações do continente americano como Chile e EUA, se observou uma prevalência maior que 15% (Piazuelo *et al.*, 2010).

São estimados anualmente, mais de 50 mil casos de carcinoma gástrico EBV-positivos mundialmente. No Brasil, a frequência da infecção por EBV varia de 5 a 11,3% nas amostras de CG estudadas (Lima & Rabenhorst, 2006; Lima *et al.*, 2008).

#### 1.4.4 Características Clínico-Patológicas e Moleculares do EBV

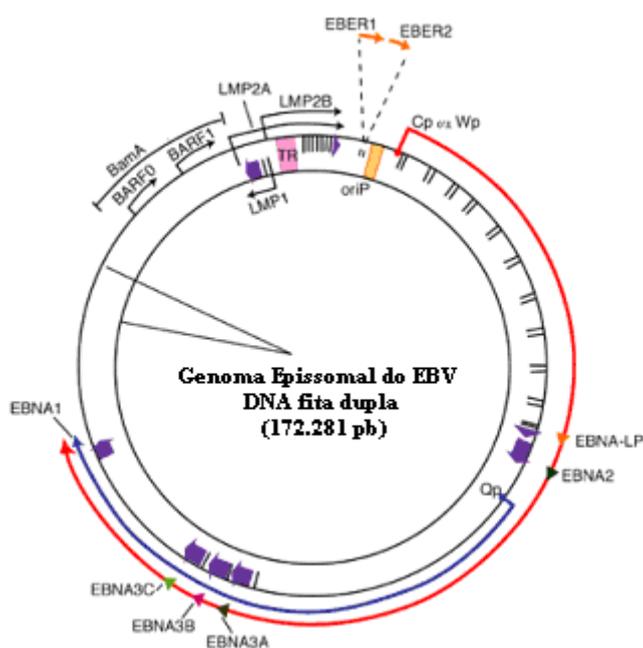
O envolvimento etiológico do EBV na carcinogênese gástrica é fortemente evidenciada pela presença uniforme de EBER nas células tumorais, mas não nas células epiteliais normais circundantes e também pela detecção de epissomas de EBV monoclonais. Entretanto, deve ser ressaltado, que a presença de EBV clonal em toda célula tumoral, simplesmente indica a presença de EBV antes da última transformação que gerou o tumor. Observações adicionais que reforçam este envolvimento etiológico são anticorpos elevados contra antígenos de EBV em amostras de soros anteriores ao estabelecimento do diagnóstico de EBV-CG (Chang e Kim, 2005). Apesar de se considerar que o EBV tem um importante papel no desenvolvimento de uma parte dos carcinomas gástricos, a proteína latente de membrana 1 (LMP-1), uma importante oncoproteína do EBV, é raramente expressa neste carcinomas. De forma diversa, os EBERs são expressos em quase todas as células de EBV-CG, evidenciando a sua importância para o desenvolvimento e estabelecimento do carcinoma (Gulley, 2001).

No estado epissomal, o EBV é descrito como latente e pode-se verificar a expressão de 12 genes, dependendo do tipo celular ou estado imunológico do hospedeiro (Figura 10). Os produtos desses genes incluem seis antígenos nucleares do EBV (EBNAs 1, 2, 3A, 3B e 3C e EBNA-LP), três proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-2A e LMP-2B), duas pequenas moléculas de RNA (EBER-1 e 2) e transcritos com múltiplos *splicing* da região BamHI A do genoma viral (BARF0 e de BARF1) (Tang *et al.*, 2012).

O padrão de expressão viral em CG foi estabelecido por Sugiura *et al.* (1996), que verificaram a presença das proteínas: EBNA-1, EBERs, BARF0, BARF1 e LMP2A. Essas

proteínas são sempre expressas em CG-EBV positivos, com exceção de LMP2A que pode ou não ser expressa.

O epissoma do EBV nas células B de memória, não expressa qualquer das proteínas de latência conhecidas. Contudo, quando as células de memória latentemente infectadas se dividem no entorno, o EBV expressa o seu EBNA1, que é essencial para conservar o genoma do vírus na célula, através da inserção do mesmo no DNA celular, permitindo assim a sua replicação (Yates *et al.*, 1985) .



**Figura 10:** Representação esquemática do genoma do vírus Epstein-Barr (EBV) - O diagrama demonstra a localização e transcrição dos genes latentes do EBV no DNA viral. A origem da replicação plasmidial (OriP) é demonstrada em amarelo. As setas em lilás representam os éxons para cada proteína latente e indicam a direção em que cada gene é transcrito. LMP2A e LMP2B são formadas por vários exons localizados próximos a sequência de repetição terminal (TR), em rosa. As setas em laranja representam a alta transcrição de RNAs, EBER1 e EBER2. Os transcritos BARF0 e de BARF1 estão localizados na região BamA (Adaptado de Osato e Imai, 1996; e de Murray e Young, 2001).

As proteínas dos genes latentes do EBV podem atuar nos mecanismos de proliferação e morte celular, levando a formação do tumor. A presença do EBV em neoplasias sólidas têm sido frequentemente descrita (Uozaki e Fukayama, 2008).

Estudos demonstraram que os EBERs devem contribuir para a tumorigênese e também para o quadro de latência do EBV (Raab-Traub, 1991; Aerts *et al.*, 2004). O EBNA1 pode desempenhar um importante papel na tumorigênese. Foi sugerido que o EBNA1 pode favorecer o aumento da expressão do oncogene *MYC* (Drotar *et al.*, 2003).

A superexpressão de *MYC* está associada a mais de 50% dos cânceres humanos e frequentemente é relacionada a um pior prognóstico e a fenótipos mais invasivos. Foi demonstrado que a proteína *MYC* contribui para a tumorigênese através da indução de instabilidade genômica, proliferação, angiogênese e crescimento celular descontrolado (Arvanitis e Felsher, 2005). Adicionalmente o *C-MYC* induz uma incorreta iniciação de replicação, quebra de DNA, alterações nos mecanismos de reparo do DNA, mutações pontuais e remodelamento da organização nuclear 3D de telômeros e cromossomas, criando assim condições topológicas que iniciam instabilidade genômica no núcleo da célula (Louis *et al.*, 2005). O oncogene *C-MYC* parece ser fundamental no processo de carcinogênese e a amplificação do *locus C-MYC* pode ser preditivo da agressividade do câncer gástrico do tipo intestinal (Burbano *et al.*, 2006; Calcagno *et al.*, 2006)

Niller *et al.* (2003), demonstraram que uma região de 130pb, logo acima do gene viral EBER-1, contém uma sequência consenso para a ligação a proteína *MYC*. Portanto, o EBER1 é possivelmente transativado por essa proteína.

Diversos trabalhos têm estudado a associação do EBV ao adenocarcinoma gástrico e os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese induzida pelo vírus. Alguns estudos têm associado a presença do EBV, com a elevada frequência de metilação de regiões promotoras de genes reguladores do ciclo celular, genes de reparo e de proteção

do DNA, genes de adesão celular e de apoptose (Osawa *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2003; Sudo *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que o domínio Gly/Ala do EBNA1, evita o processamento proteossoma-dependente para apresentação no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, o que permite ao vírus evadir-se da resposta pelo linfócito T citotóxico CD8+. Apesar desta estratégia, a EBNA1 não escapa totalmente da apresentação via MHC de classe I e do reconhecimento específico pelo linfócito T CD8+, em células B transformadas pelo EBV, particularmente em indivíduos com certos haplótipos de antígeno leucocitário humano (HLA) (Chen, 2011).

#### **1.4.5 Diagnóstico da Infecção por EBV no Câncer Gástrico**

Pacientes com EBV-CG apresentam altos títulos de anticorpos contra os antígenos de EBV, em especial imunoglobulina (Ig) G e IgA contra antígenos do capsídeo viral, por um período maior que 5 anos, antes do diagnóstico de câncer gástrico. Este comportamento sorológico sugere que a reativação do EBV, que produz proteínas líticas mais que as latentes, acontece antes do desenvolvimento do carcinoma gástrico (Koshiol *et al.*, 2007). De fato, considera-se que a reativação de infecções líticas nas tonsilas de portadores saudáveis de EBV, ocorre regularmente (Babcock *et al.*, 1998).

De forma diversa de outros herpesvírus, o EBV não evoca um efeito citopático viral, o que dificulta o diagnóstico através das técnicas citológicas tradicionais. As manifestações dos tumores associados ao EBV são também variáveis e dependem do *status* imunológico dos pacientes. Portanto o conhecimento da imunocompetência (*e.g.* infecção por HIV e imunossupressão pós-transplante) e do *status* do paciente em relação ao EBV combinados com a citomorfologia e resultados auxiliares, são frequentemente necessários

para a realização do diagnóstico de malignidades associadas ao EBV (Michelow *et al.*, 2012).

Existem vários métodos para se determinar a presença da infecção por EBV. Entre estes se incluem os métodos sorológicos como os testes baseados na detecção de anticorpos heterófilos e os métodos de ELISA, métodos moleculares como a carga viral para o EBV, que ajuda a distinguir um portador sã de um que esteja em estado de doença (Gulley e Tang, 2008). Os níveis de DNA de EBV no plasma ou soro determinam resposta a terapia, altos níveis anteriores a terapia são indicadores de um mau prognóstico e um teste de recorrência (Gulley *et al.*, 2002). Para os tumores o EBV pode ser demonstrado através de anticorpos contra os seus antígenos EBNA e LMP que podem ser demonstrados através de imunofluorescência e coloração imunohistoquímica de membrana ou citoplasma, hibridização *in situ* para detecção de EBERs e técnicas moleculares como o Southern blot e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Hecht *et al.*, 2002).

A utilização destas técnicas aliadas a técnica de coloração tradicional com identificação de histotipos de alto e baixo grau, melhora a avaliação prognóstica e tratamento dos pacientes (Chiaravalli *et al.*, 2012).

As principais técnicas para detecção do EBV em espécimes tumorais são a PCR, PCR transcriptase reversa (RT-PCR) e hibridação *in situ* (HIS). As técnicas de PCR e RT-PCR amplificam as sequências conservadas do genoma viral, porém podem amplificar sequências nucleotídicas provenientes de outras células, tais como linfócitos infectados infiltrados no tecido (Gulley, 2001).

O ensaio de HIS é considerado o *gold standart* (padrão ouro) e utiliza sondas complementares tanto à sequência de genoma viral quanto a segmentos de RNAm viral (EBERs), o que permite a identificação das células que estão infectadas pelo EBV (Tsuchiya, 2002; Michelow *et al.*, 2012 ). A HIS é uma técnica eficaz, pois os EBERs são

expressos em elevada quantidade e encontrados em diferentes tecidos infectados pelo vírus. A detecção dos EBERs é facilitada por não serem poli-adenilados, o que os restringe ao núcleo da célula hospedeira (Takada & Nanbo, 2001).

### 1.5 *HELICOBACTER PYLORI* E EBV EM CÂNCER GÁSTRICO

Existem vários fatores etiológicos envolvidos na carcinogênese gástrica como baixo *status* sócio-econômico, dieta, fatores hereditários e a infecção por *H. pylori* os quais são os mais citados em estudos sobre esta neoplasia. Além da *H. pylori*, a infecção por EBV também está associada ao desenvolvimento deste tipo de câncer (Smith *et al.*, 2006).

A descoberta da *H. pylori* na década de 80 foi um marco no entendimento da patogênese do câncer gástrico. Inicialmente associada de forma causal a gastrite e úlcera péptica, diversas evidências associaram a bactéria ao CG uma década após o seu isolamento (Piazuelo *et al.*, 2010).

Não obstante a vasta bibliografia relacionada a outros tumores, o primeiro relato sobre a associação do EBV com carcinomas gástricos foi sobre um caso de carcinoma gástrico do tipo linfoepitelial (Burke *et al.*, 1990). Logo após o vírus foi identificado em carcinomas gástricos comuns (Shibata e Weiss, 1992). O padrão de expressão de genes codificados pelo EBV no carcinoma gástrico é diverso do que é observado em linfoma de Burkitt e em carcinoma de nasofaringe, sugerindo que o mecanismo oncogênico do EBV no carcinoma gástrico pode ser único (Lee *et al.*, 2004).

Com a finalidade de entender o processo carcinogênico desencadeado por estes dois agentes infecciosos, alguns trabalhos têm pesquisado alterações em genes e proteínas onde estes agentes podem atuar, sugerindo portanto, possíveis vias patogênicas. As proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e apoptose, como p53 e c-Myc, emergem como

candidatas a desenvolver um papel crucial no desenvolvimento destas neoplasias (Lima *et al.*, 2008).

Vários trabalhos têm estudado a associação isolada entre a *H. pylori* ou o EBV e o câncer gástrico. Todavia, poucos estudos têm investigado a associação conjunta destes dois agentes nas neoplasias gástricas.

No presente trabalho foram determinadas a prevalência e as características clínico-patológicas e o *status* para EBV em 125 pacientes com adenocarcinoma gástrico e correlacionados com o *status* para *H. pylori* e para a cepa *cagA* de *H. pylori*, a fim de se explorar os seus papéis na carcinogênese gástrica, em uma população do norte do Brasil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Pesquisar a prevalência e o grau de associação da infecção por *Helicobacter pylori* e do vírus de Epstein-Barr em adenocarcinoma gástrico, em amostras de uma população do norte do Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a infecção por *Helicobacter pylori* nestas neoplasias através da técnica de PCR para o gene *urease A*.
- Identificar a cepa *cagA* nas amostras em estudo através da técnica de PCR.
- Investigar a presença do vírus de Epstein-Barr através da técnica de *hibridização in situ*.
- Correlacionar os resultados encontrados nestas análises e avaliar a existência de associação dos mesmos com o sexo e idade do paciente, e com a localização, estádios e tipo histológico dos adenocarcinomas gástricos estudados.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA:**

Foram utilizadas amostras histológicas de adenocarcinoma gástrico de 125 pacientes submetidos à exame endoscópico ou ressecção cirúrgica no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB) e no Hospital Ophir Loyola, localizados na cidade de Belém, no Estado do Pará.

Foram selecionados pacientes com adenocarcinoma gástrico tanto do sexo masculino quanto do sexo feminino, cuja faixa etária variou de 26 a 89 anos de idade.

Durante o estudo foi realizado um contato prévio com cada paciente, onde foram fornecidas informações acerca do objetivo da pesquisa, além do formulário para assinatura do termo de consentimento pós-informado, para posterior coleta do material (ANEXO I). O presente trabalho faz parte do projeto “Estudo de Câncer Gástrico no Pará”, aprovado pelo comitê de Ética do HUIBB (ANEXO II).

Todos os espécimes foram coletados antes da administração de tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos. Em seguida, a amostra tumoral foi seccionada em duas partes: uma parte para o diagnóstico histopatológico rotineiro e outra, para realização das técnicas de biologia molecular.

As amostras foram encaminhadas para estudo de acordo com o fluxograma constante no Anexo III.

#### **3.2 ANATOMIA E HISTOPATOLOGIA**

Os dados anatômicos e histopatológicos como localização, subtipo tumoral, grau de diferenciação, profundidade da invasão, acometimento dos linfonodos e/ou metástases à

distância, bem como gênero e idade dos pacientes, foram fornecidos nos laudos histopatológicos realizados pelo Departamento de Patologia do HUIBB. Para a classificação histológica foi utilizada a classificação de Lauren (1965).

### 3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

As amostras histológicas destinadas ao estudo molecular foram imediatamente colocadas em criotubos e depois congeladas e estocadas em nitrogênio líquido para preservar a integridade do material de interesse. As técnicas de PCR para detecção de *H. pylori* e da cepa *cagA+* de *H. pylori*, bem como a técnica de hibridização *in situ*, foram realizadas no Laboratório de Citogenética Humana, do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA.

#### 3.3.1 Investigações Sobre *Helicobacter pylori*

##### 3.3.1.1 Extração de DNA

A extração e a amplificação de DNA a partir das amostras de tecido gástrico tumoral foram realizadas conforme o protocolo estabelecido pelo kit da QiaAmp (Qiagen®). Posteriormente, o DNA extraído foi armazenado no freezer -80°C.

##### 3.3.1.2 Diagnóstico por PCR

Para a detecção de *H. pylori* através da técnica de PCR, foi utilizado o par de oligonucleotídeos descritos por Clayton *et al.* (1992), o qual amplifica um fragmento de 411pb do gene da *urease A* (Tabela 3). As condições adequadas para o PCR foram 40

ciclos de amplificação em 3 etapas, sendo a primeira de desnaturação por 1 minuto a 94°C, a segunda de associação por 1 minuto a 63°C e a terceira de extensão por 1 minuto a 72°C.

Como controle negativo foi utilizado água estéril e como controle positivo uma amostra de material sabidamente positivo para *H. pylori*.

### 3.3.1.3 Determinação da Presença do Gene *cagA*

Para detecção da presença do gene *cagA* a partir das amostras positivas para *H. pylori* foram utilizados oligonucleotídeos descritos por Covacci *et al.* (1993), que amplifica um fragmento de 535pb do gene (Tabela 3). A reação de PCR foi realizada em 35 ciclos de amplificação, a etapa de desnaturação ocorreu por 1 minuto a 95°C, o anelamento por 1 minuto a 57°C e a extensão por 1 minuto a 72°C, com uma extensão final de 15 minutos a 72°C.

**Tabela 3:** Oligos utilizados na determinação dos genes *urease* e *cagA*

Gene	Sequência
<i>ureA</i> (sense)	5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3'
<i>ureA</i> (antisense)	5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'
<i>cagA</i> (sense)	5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3'
<i>cagA</i> (antisense)	5'TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3'

### 3.3.2 Investigação Sobre EBV

#### 3.3.2.1 Lâminas com Cortes Histológicos

Os cortes histológicos destinados a investigação do EBV pela técnica de HIS foram fixados em lâminas para microscopia devidamente limpas em acetona, e tratadas com silano a 4%. Duas lâminas de cada bloco foram obtidas para estudo.

#### 3.3.2.2 Hibridização *in situ*

O método utilizado neste estudo foi adaptado do descrito por Bacchi *et al.* (1996). A sonda utilizada, descrita por Shibata *et al.* (1991), apresenta uma sequência oligonucleotídica de 30pb, biotinalada na extremidade 3' (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA-3'), complementar ao RNA viral EBER1. O método segue os seguintes procedimentos:

a) Desparafinação e hidratação das lâminas – as lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida a 60°C, durante 120 minutos. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em xilol aquecido a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, foram submetidas a uma bateria de xileno (I, II e III) – álcool 100% (I, II e III) – álcool 80% – água;

b) Bloqueio da Peroxidase endógena – as lâminas foram mergulhadas em um borel contendo peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 minutos;

c) Digestão enzimática com proteinase K – a proteinase K em concentração final de 0,02 µg/µL, por 13 minutos;

d) Lavagem em água com DEPC 0,1%;

e) Desidratação em gradiente de água e de álcool em concentração de 80%, 100% (I, II e III);

f) Incubação com solução de pré-hibridização – a solução de pré-hibridização consiste em Solução de Denhardt (3,5 X); SSC (4,5X); EDTA (0,0075M); SDS (0,35%); DNA desnaturado de esperma de salmão (75µg/µL); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,75M); Sulfato de Dextrano (10%), as lâminas foram incubadas por 60 minutos à 37°C.

g) Incubação em solução de hibridação – a solução de hibridação consiste em Solução de Denhardt (2X); Formamida (50%); Sulfato de Dextrano (2%); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,002M); e sonda (0,3 ng/µL), por 16 horas em estufa à 37°C.

h) Incubação das lâminas com anticorpo anti-biotina (DakoCytomation®) (diluição 1:20), por 30 minutos;

i) Incubação com conjugado enzimático (DakoCytomation®) (diluição 1:100), por 45 minutos;

j) Revelação com cromógeno DAB líquido (3,3'-diaminobenzidine) (DakoCytomation®), preparado conforme recomendações do fabricante;

k) Contra-coloração – as lâminas foram mergulhadas em um borel contendo Hematoxilina de Harris a 40%.

l) Desidratação em gradiente de água – álcool – xilol

m) Montagem com lamínulas utilizando Bálsamo do Canadá.

Como controle foi utilizado lâmina de adenocarcinoma gástrico sabidamente positiva para EBV.

### 3.3.2.3 Critérios para Análise das Lâminas

Na análise das lâminas foi admitida como marcação positiva a presença de uma coloração marrom característica, adquirida pelo cromógeno após oxidação, situadas nas regiões celulares previstas para cada alvo avaliado em contraste com o azul/violeta conferido pela hematoxilina. Esta coloração foi constatada por microscopia óptica.

Na técnica de HIS, considerou-se positivo qualquer marcação nuclear em células tumorais, independente do percentual de células marcadas.

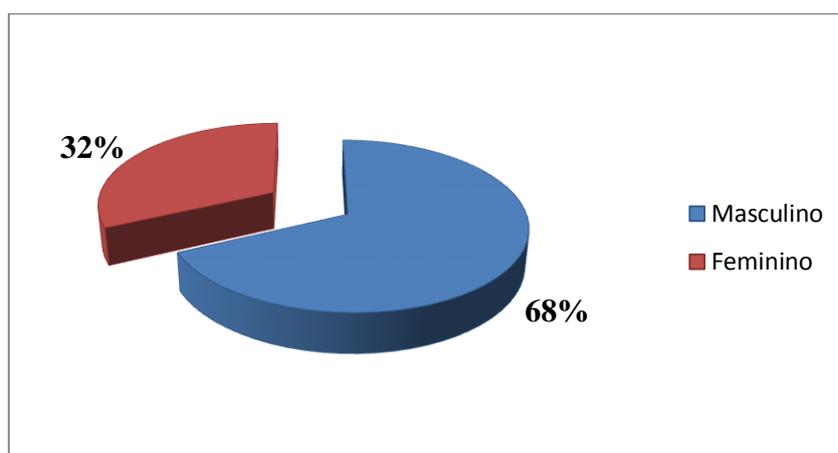
### 3.4 CORRELAÇÃO DE DADOS

Os resultados obtidos na técnica de PCR para detecção de *H. pylori*, na técnica de PCR para identificação das cepas *cagA+* e HIS para identificação do EBV, foram correlacionados entre si, e avaliados quanto a existência de associação dos mesmos com a idade e sexo dos pacientes, bem como a localização, estádios e tipo histológico dos adenocarcinomas gástricos estudados. O programa estatístico utilizado foi o SPSS v 17.0 (SPSS, Chicago, IL. EUA), utilizando-se o Teste de Análise Univariada - Teste Exato de Fisher, Análise Multivariada - Regressão Logística Controlada por Gênero e o *Odds Ratio* (OR), com um Intervalo de Confiança (IC) de 95%. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ , bilateral.

Os gráficos dos resultados obtidos foram realizados com o “software” *Microsoft Excel* versão 2010.

#### 4 RESULTADOS

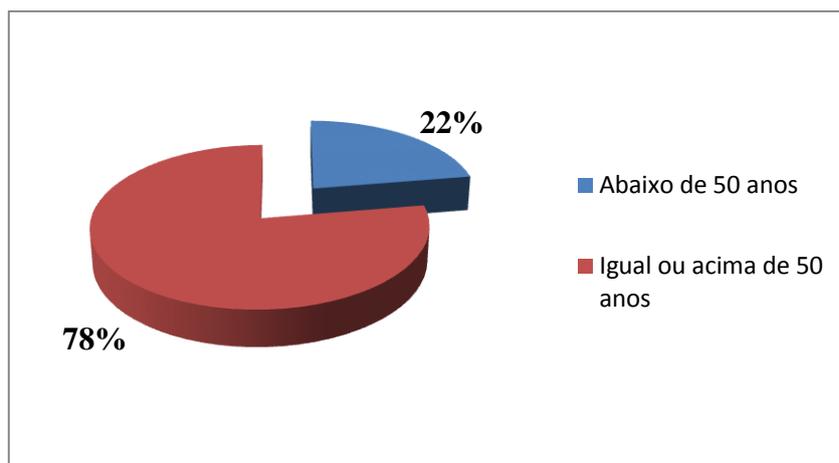
A Figura 11 demonstra, na população estudada (N=125), a frequência de casos de acordo com o gênero dos pacientes. Observou-se que 68,0% dos pacientes eram do sexo masculino (N=85), enquanto que, as pacientes do sexo feminino corresponderam a 32,0% (N=40).



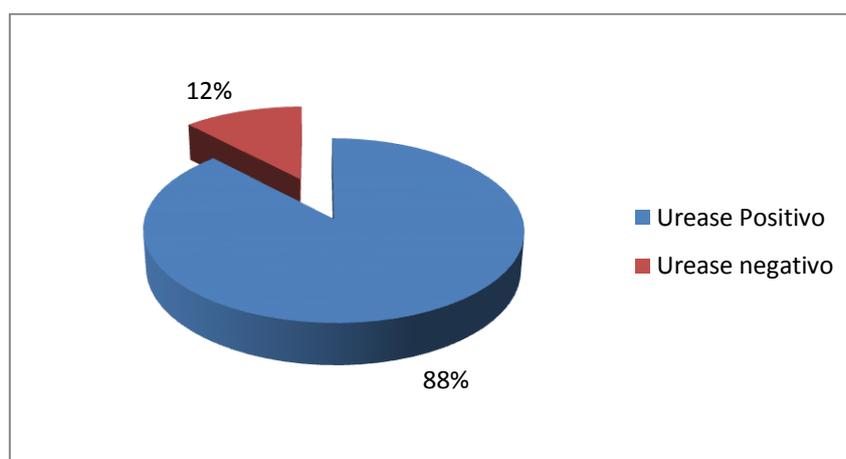
**Figura 11** - Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico de acordo com o gênero, em uma população do norte do Brasil.

A Figura 12 demonstra, na população estudada, a frequência de casos de acordo com a faixa etária dos pacientes. Observou-se que 78,0% dos pacientes pertencem à faixa etária que está igual ou acima dos 50 anos (N=97), enquanto que 22,0% dos pacientes se encontram na faixa etária que está abaixo de 50 anos (N=28).

A Figura 13 mostra, na população estudada, a frequência de casos de acordo com a positividade para urease. Observou-se que 88,0% dos pacientes apresentaram resultado positivo para urease (N=110), enquanto que 12,0% dos pacientes apresentaram resultado negativo para urease (N=15). Estes resultados demonstram a alta prevalência da infecção por *H. pylori* em pacientes com câncer gástrico.



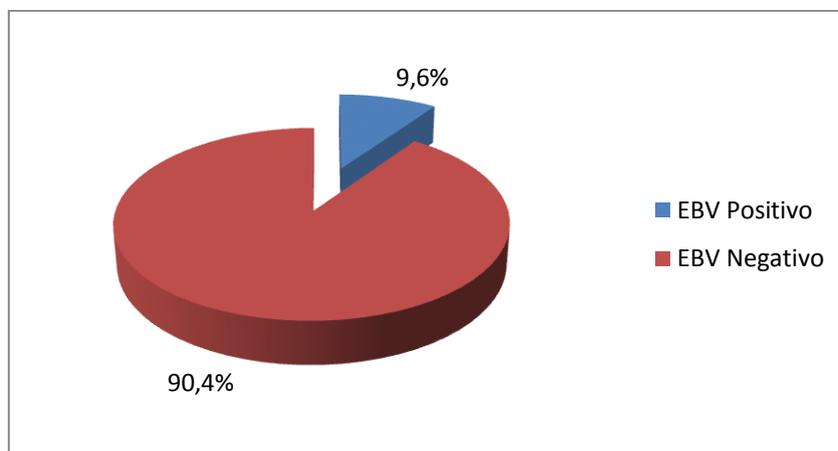
**Figura 12** - Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a faixa etária, em uma população do norte do Brasil.



**Figura 13** - Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a positividade para *urease*, em uma população do norte do Brasil.

A Figura 14 demonstra, na população estudada, a frequência de casos de acordo com a positividade para o EBV. Observou-se que 9,6% dos pacientes apresentaram

resultado positivo para o EBV (N=12), enquanto que 90,4% dos pacientes apresentaram resultado negativo para o EBV (N=113).



**Figura 14** - Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a positividade para o EBV, em uma população do norte do Brasil.

A tabela 4 mostra a distribuição de acordo com o gênero e a idade, de resultados positivos para as variáveis *cagA*, EBV e urease, nas amostras histológicas de 125 pacientes envolvidos no presente estudo, bem como os resultados da análise estatística.

Observou-se nos casos positivos para a cepa *cagA*, um percentual de 71,4% de homens que foram positivos e um percentual de 28,6% de mulheres que foram positivas, e de acordo com a faixa etária considerando-se ambos os sexos, observou-se uma frequência de 17,9% para pacientes com idade abaixo de 50 anos e 82,1% para pacientes acima de 50 anos.

Frente aos casos positivos para o EBV observou-se uma frequência de 91,7% para homens e 8,3% para as mulheres, e de acordo com a faixa etária considerando-se ambos os sexos, observou-se uma frequência de 8,3% para pacientes com idade abaixo de 50 anos e 91,7% para pacientes acima de 50 anos.

Com relação às amostras positivas para *urease* observou-se uma frequência de 71,8% para homens e 28,2% para as mulheres, e de acordo com a faixa etária considerando-se ambos os sexos, observou-se uma frequência de 20,0% para pacientes com idade abaixo de 50 anos e 80,0% para pacientes acima de 50 anos.

**Tabela 4:** Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para *cagA*, EBV e *urease*, de acordo com o gênero e a idade, em uma população do norte do Brasil.

Presença	Mulheres N=40(%)	Homens <sup>3</sup> N=85(%)	Univariada <sup>1</sup>		<50 anos N=28(%)	>50 anos <sup>3</sup> N=97(%)	Univariada <sup>1</sup>	
			P	OR (IC95%)			P	OR (IC95%)
<i>CagA</i>	24 (28,6)	60(71,4)	0,307	1,600 (0,729-3,511)	15(17,9)	69(82,1)	0,109	2,136 (0,901-5,061)
<i>EBV</i>	1(8,3)	11(91,7)	0,101	5,797 (0,722-46,568)	1(8,3)	11(91,7)	0,296	3,453 (0,426-27,985)
<i>Urease</i>	31(28,2)	79(71,8)	0,19	3,823 (1,256-11,638)	22(20)	88(80)	0,101	2,667 (0,858-8,286)

<sup>1</sup>Análise Univariada, Teste Exato de Fisher; <sup>2</sup>Análise Multivariada, Regressão Logística controlada por Gênero; IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio; <sup>3</sup>Características testadas para análise de risco.

A tabela 5 mostra, nas amostras em estudo, a distribuição de acordo com a localização anatômica, de resultados positivos para as variáveis *cagA*, EBV e *urease*, assim como os resultados da análise estatística.

Observou-se nos casos positivos para a cepa *cagA*, uma frequência de 45,2% para tumores localizados na cárdia e 54,8% para tumores não cárdia, ou seja, localizados no antro e corpo do estômago.

Frente aos casos positivos para o EBV observou-se uma frequência de 50,0% tanto para tumores localizados na cárdia quanto para tumores não cárdia. Com relação às amostras positivas para *urease* observou-se uma frequência de 44,5% para tumores localizados na cárdia e uma frequência de 55,5% para tumores não cárdia.

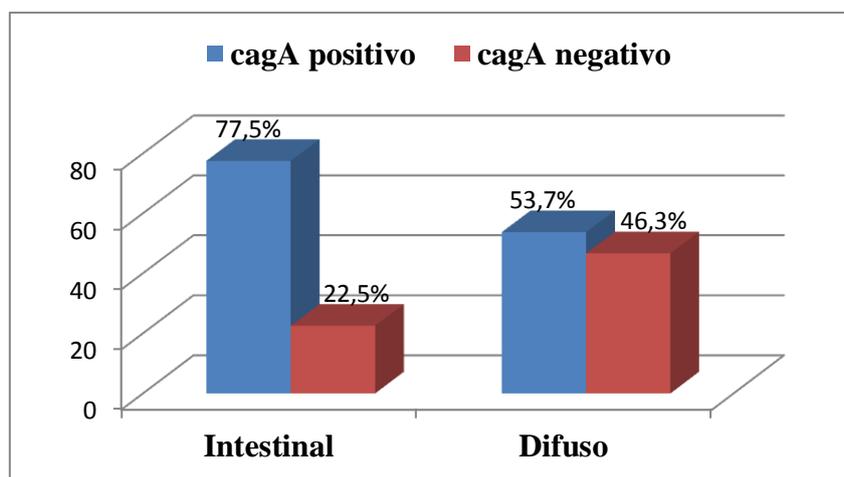
Apesar de não haver significância estatística, a análise destes dados nos mostra uma tendência onde indivíduos com tumores de localização não cárdia têm, 70,3% menos chance de estar relacionado a infecção por *H. pylori*.

**Tabela 5:** Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para *cagA*, EBV e *urease*, de acordo com a localização anatômica das lesões, em uma população do norte do Brasil.

Presença	Cárdia N=52(%)	Não cárdia <sup>3</sup> N=73(%)	Univariada <sup>1</sup>		Multivariada <sup>2</sup>	
			P	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)
<i>cagA</i>	38(45,2)	46(54,8)	0,254	0,628(0,289-1,363)	0,245	0,627(0,285-1,378)
EBV	6(50)	6(50)	0,553	0,687(0,208-2,262)	0,507	0,662(0,196-2,236)
<i>Urease</i>	49(44,5)	61(55,5)	0,095	0,311(0,083-1,165)	0,079	0,297(0,076-1,153)

<sup>1</sup>Análise Univariada, Teste Exato de Fisher; <sup>2</sup>Análise Multivariada, Regressão Logística controlada por Gênero; IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio; <sup>3</sup>Características testadas para análise de risco.

A Figura 15 demonstra que para tumores do tipo intestinal (N=71) a frequência de amostras *cagA* positivas foi de 77,5% (N=55) e a frequência de amostras *cagA* negativas foi de 22,5% (N=16). Para tumores do tipo difuso (N=54) a frequência de amostras *cagA* positivas foi de 53,7% (N=29) e a frequência de amostras *cagA* negativas foi de 46,3% (N=25).



**Figura 15** - Frequência de amostras positivas e negativas para *cagA*, em pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a classificação histológica dos tumores, em uma população do norte do Brasil.

A tabela 6 mostra, nas amostras em estudo, a distribuição de acordo com a classificação histológica, de resultados positivos para as variáveis *cagA*, EBV e *urease*, assim como os resultados da análise estatística.

Observou-se nos casos positivos para a cepa *cagA*, uma frequência de 65,5% para tumores do tipo intestinal e 34,5% para tumores do tipo difuso. Frente aos casos positivos para o EBV observou-se uma frequência de 66,7% para tumores do tipo intestinal e 33,3% para tumores do tipo difuso. Com relação às amostras positivas para *urease* observou-se uma frequência de 59,1% para tumores do tipo intestinal e uma frequência de 40,9% para tumores do tipo difuso.

A análise univariada e multivariada mostrou significância estatística quando se realizou uma correlação entre a variável *cagA* e os tipos histológicos intestinal e difuso ( $p=0,007$  e  $p=0,008$ ), onde o tipo difuso apresenta um fator de proteção relativo (O.R. menor que 1) de 0,348 quando comparado ao tipo intestinal, ou seja, os pacientes positivos para *cagA*, que é a cepa mais virulenta de *H. pylori*, tem 65,2% menos chance de desenvolver o adenocarcinoma do tipo difuso.

**Tabela 6:** Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para *cagA*, EBV e *urease*, de acordo com a classificação histológica dos tumores, em uma população do norte do Brasil.

Presença	Intestinal N=71(%)	Difuso <sup>3</sup> N=54(%)	Univariada <sup>1</sup>		Multivariada <sup>2</sup>	
			P	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)
<i>cagA</i>	55(65,5)	29(34,5)	0,007*	0,337(0,156-0,730)	0,008*	0,348(0,159-0,761)
EBV	8(66,7)	4(33,3)	0,551	0,630(1,79-2,213)	0,644	0,738(0,203-2,679)
<i>Urease</i>	65(59,1)	45(40,9)	0,177	0,462(0,154-1,388)	0,195	0,470(0,150-1,473)

<sup>1</sup>Análise Univariada, Teste Exato de Fisher; <sup>2</sup>Análise Multivariada, Regressão Logística controlada por Gênero; IC: Intervalo de Confiança; OR - Odds Ratio; <sup>3</sup>Características testadas para análise de risco; \* $p \leq 0,05$ .

A tabela 7 mostra, nas amostras em estudo, a distribuição de acordo com o estadiamento dos tumores, de resultados positivos para as variáveis *cagA*, EBV e *urease*, assim como os resultados da análise estatística.

Observou-se nos pacientes positivos para a cepa *cagA*, uma frequência de 14,3% para tumores pertencentes ao nível de estadiamento I e II e uma frequência de 85,7% para tumores pertencentes ao nível de estadiamento III e IV. Frente aos casos positivos para o EBV observou-se uma frequência de 100,0% para tumores pertencentes ao nível de estadiamento III e IV. Com relação às amostras positivas para *urease* observou-se uma frequência de 17,3% para tumores pertencentes ao nível de estadiamento I e II e uma frequência de 82,4% para tumores pertencentes ao nível de estadiamento III e IV.

**Tabela 7:** Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para *cagA*, EBV e *urease*, de acordo com o estadiamento dos tumores, em uma população do norte do Brasil.

Presença	I e II	III e IV <sup>3</sup>	Univariada <sup>1</sup>		Multivariada <sup>2</sup>	
	N=22(%)	N=103(%)	P	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)
<i>cagA</i>	12(14,3)	72(85,7)	0,211	1,935 (0,757-4,949)	0,526	1,410(0,487-4,083)
EBV	0(0)	12(100)	0,123	0,805(0,736-0,882)	0,998	-
<i>Urease</i>	19(17,3)	91(82,4)	0,727	1,197(0,308-4,657)	0,587	0,652(0,140-3,047)

<sup>1</sup>Análise Univariada, Teste Exato de Fisher; <sup>2</sup>Análise Multivariada, Regressão Logística controlada por Gênero;

IC: Intervalo de Confiança; OR - Odds Ratio; <sup>3</sup>Características testadas para análise de risco.

A tabela 8 mostra, nas amostras em estudo, a distribuição de acordo com o positividade e negatividade para *cagA*, de resultados positivos para as variáveis EBV e *urease*, assim como os resultados da análise estatística.

Observou-se nos pacientes positivos para EBV, uma frequência de 75,0% para tumores *cagA* positivos e uma frequência de 25,0% para tumores *cagA* negativos. Frente

aos casos positivos para *urease*, observou-se uma frequência de 76,4% para tumores *cagA* positivos e uma frequência de 23,6% para tumores *cagA* negativos.

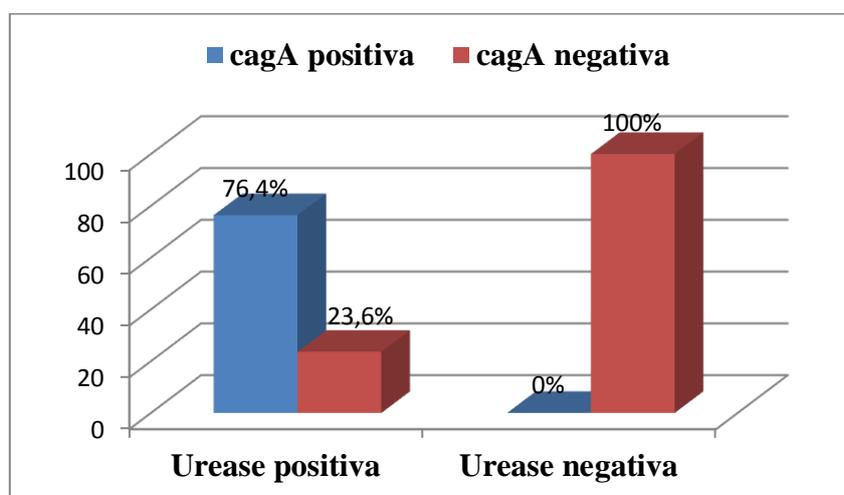
A análise estatística univariada mostrou significância estatística quando se realizou uma correlação entre a variável *urease* e os tumores *cagA* positivos ( $p=0,000$ ), onde os casos positivos para *urease* associados a positividade para *cagA* apresentam um fator de risco relativo (O.R. maior que 1) de 4,231, quando comparado aos casos positivos para *urease* e associados a tumores *cagA* negativos, ou seja, os pacientes com adenocarcinoma gástrico positivos para *urease* tem 423,1% a mais de chance de apresentar positividade para *cagA*, que é a cepa mais virulenta de *H. pylori*.

**Tabela 8:** Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para EBV e *urease*, de acordo com a positividade e a negatividade para *cagA*, em uma população do norte do Brasil.

Presença	<i>cagA</i> Positiva <sup>3</sup>	<i>cagA</i> Negativa	Univariada <sup>1</sup>		Multivariada <sup>2</sup>	
	N=84(%)	N=41(%)	P	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)
<b>EBV</b>	9(75)	3(25)	0,749	1,520(0,389-5,944)	0,783	1,217(0,300-4,934)
<b>Urease</b>	84(76,4)	26(23,6)	0,000*	4,231(3,024-5,920)	0,996	8,65(-)

<sup>1</sup>Análise Univariada, Teste Exato de Fisher; <sup>2</sup>Análise Multivariada, Regressão Logística controlada por Gênero; IC: Intervalo de Confiança; OR - Odds Ratio; <sup>3</sup>Características testadas para análise de risco; \* $p \leq 0,05$ .

A Figura 16 mostra a frequência de amostras positivas e negativas para *cagA*, em tumores *urease* positivos e tumores *urease* negativos. Observou-se nos casos positivos para *urease*, uma frequência de 76,4% para tumores *cagA* positivos, com uma grande significância estatística ( $p=0,000$ ), e observou-se uma frequência de 23,6% para tumores *cagA* negativos. Nas amostras *urease* negativas, a frequência de 100,0% de negatividade para *cagA* é evidenciada, visto que, a presença de *cagA* somente é observada em tumores positivos para a presença de *H. pylori*.



**Figura 16** - Frequência de amostras positivas e negativas para *cagA*, em pacientes com adenocarcinoma gástrico, de acordo com a positividade e a negatividade para *urease*, em uma população do norte do Brasil.

A tabela 9 mostra, nas amostras em estudo, a distribuição de acordo com a positividade e negatividade para EBV, de resultados positivos para a variável *uréase*, bem como os resultados da análise estatística. Observou-se nos pacientes positivos para *urease*, uma frequência de 10,9% para tumores EBV positivos e uma frequência de 89,1% para tumores EBV negativos.

**Tabela 9:** Frequência de pacientes com adenocarcinoma gástrico, positivos para *urease*, de acordo com a positividade e negatividade para EBV, em uma população do norte do Brasil.

Presença	EBV Positiva <sup>3</sup>	EBV Negativa	Univariada <sup>1</sup>		Multivariada <sup>2</sup>	
	N=12(%)	N=113(%)	P	OR (IC95%)	P	OR (IC95%)
<i>Urease</i>	12(10,9)	98(89,1)	0,357	1,122(1,051-1,198)	0,999	1,456(-)

<sup>1</sup>Análise Univariada, Teste Exato de Fisher; <sup>2</sup>Análise Multivariada, Regressão Logística controlada por Gênero; IC: Intervalo de Confiança; OR - Odds Ratio; <sup>3</sup>Características testadas para análise de risco.

## 5 DISCUSSÃO

O carcinoma gástrico é um dos poucos neoplasmas malignos nos quais os agentes infecciosos tem um importante papel etiológico. A difusão destes agentes em uma determinada população e as consequências de sua infecção representam um universo preocupante aos setores de saúde pública em todo o mundo, em especial quando se trata de um agente oncogênico. A condição *sine qua non* para definir estratégias na prevenção e controle destes agentes, está baseada no pleno e real conhecimento de sua patogênese e de sua disseminação na comunidade, além de sua associação a fatores e a grupos de risco.

No presente trabalho foram estudadas amostras de adenocarcinoma gástrico e foi utilizada a técnica de PCR para investigar a presença de *H. pylori* e da variante *cagA* de *H. pylori*, a técnica de *hibridização in situ* para investigar a presença do vírus de Epstein-Barr, e a análise histopatológica para se avaliar as características clínico-patológicas dos espécimes em questão. Os resultados obtidos foram ordenados de uma maneira geral, de forma a estabelecer a prevalência para os agentes em questão, e foram analisados estatisticamente a fim de se avaliar a correlação entre os mesmos, e com o gênero, idade, origem, classificação histológica e estágio dos neoplasmas estudados. O presente trabalho foi o primeiro a associar as variáveis estudadas no norte do Brasil.

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012), o CG é o quarto tumor mais notificado entre os homens e o sexto entre as mulheres, e diversos trabalhos têm relacionado o gênero dos pacientes ao adenocarcinoma gástrico. Nos Estados Unidos (EUA) o trabalho de Yang *et al.* (2011), demonstrou uma frequência de 63% para indivíduos do sexo masculino e 37% para o sexo feminino e o estudo de Pereira *et al.* (2001) em Belém-PA, identificou uma frequência de 72% para o sexo masculino e 28% para o sexo feminino. Quando comparados ao presente trabalho observou-se uma variação

de até cinco pontos percentuais nestes valores. Porém a frequência de 68% para indivíduos do sexo masculino e 32% para o sexo feminino encontradas no presente estudo, foram concordantes com o trabalho de Lima *et al.* (2011), que evidenciou uma frequência de 68,7% para o sexo masculino e 31,3% para o sexo feminino, em pacientes dos Estados do Ceará e São Paulo. Estes resultados demonstram claramente a maior prevalência destes tumores em indivíduos do sexo masculino, os quais são duas vezes mais acometidos do que as mulheres, reproduzindo os achados da literatura mundial e do Brasil.

Com relação a faixa etária dos pacientes portadores de CG o estudo de Arregi *et al.* (2009), realizado com pacientes do estado do Ceará, demonstrou para pacientes acima de 50 anos, uma frequência de 78% e para pacientes abaixo de 50 anos, uma frequência de 22%. Ferrasi *et al.* (2010), investigando pacientes dos estados do Ceará e São Paulo evidenciaram, para pacientes acima de 50 anos, uma frequência de 78,7% e uma frequência de 21,3% para pacientes abaixo de 50 anos. Estes resultados são concordantes entre si e concordantes com as frequências observadas no presente estudo (78% para pacientes acima de 50 anos e 22% para pacientes abaixo de 50 anos). A concentração dos casos na faixa etária acima de 50 anos observada em todos esses trabalhos, mostra uma tendência ao aumento da ocorrência dessa neoplasia à medida que a idade se eleva, sendo os pacientes idosos os mais acometidos, pois normalmente desenvolvem esta neoplasia após um longo período de gastrite atrófica.

A infecção por *H. pylori* é a principal causa de doenças do estômago. Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado a alta prevalência da bactéria nestas doenças, e tem fornecido evidências convincentes da associação da mesma com gastrite crônica, úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico. A infecção é usualmente adquirida na infância e quando não tratada pode persistir no hospedeiro por toda a vida (Selgrad *et al.*, 2008). De acordo com a IARC (2012), a *H. pylori* é um agente carcinogênico para o câncer gástrico,

e o estabelecimento desta relação, ocorreu através da comprovação de que a infecção crônica por *H. pylori* induz mudanças morfológicas e fisiológicas no ambiente gástrico, aumentando deste modo o risco de transformações neoplásicas. Atualmente é amplamente conhecido o fato de que a infecção crônica por *H. pylori* induz hipocloridria e gastrite atrófica, os quais são precursores do câncer gástrico (Roesler *et al.*, 2012). Em pacientes do estado de São Paulo, Thomazini *et al.* (2006) encontraram uma prevalência de 95% para *H. pylori* em adenocarcinoma gástrico. Considerando ainda pacientes do estado de São Paulo associados a pacientes do estado do Ceará, Ferrasi *et al.* (2010) encontraram para *H. pylori*, uma prevalência de 98% em carcinomas gástricos. Apesar da menor frequência (88%) encontrada no presente estudo, comparando-se aos estudos citados, observa-se, ainda assim, a alta prevalência desta bactéria em pacientes com câncer gástrico evidenciando tanto o papel causal quanto a persistência desta infecção. Quando comparada ao estudo de Pereira *et al.* (2001), em Belém-PA que encontrou uma frequência de 52% para esta bactéria em pacientes com câncer gástrico, a prevalência do presente estudo foi considerada alta.

Com relação à associação entre a infecção pelo EBV e o CG, a comprovação veio através do trabalho pioneiro de Shibata e Weiss (1992), os quais demonstraram que o EBV está ligado ao desenvolvimento de uma parcela dos carcinomas gástricos. Desde então, vários estudos tem investigado o papel carcinogênico do EBV nestes tumores, que foi demonstrada através de fortes evidências como a monoclonalidade do genoma viral, e a sua presença em praticamente todas as células tumorais, indicando que a infecção ocorreu antes da transformação maligna e que as células tumorais foram originadas de uma célula primária infectada (Lee *et al.*, 2004). O CG associado ao EBV corresponde a apenas uma fração dos carcinomas gástricos, porém considerando suas características clínico-patológicas distintas (predominância em indivíduos do sexo masculino, predisposição ao

acometimento da região proximal do estômago), suas anormalidades moleculares características (metilação global e não randômica da ilha CpG da região promotora de muitos genes relacionados ao câncer), e seu prognóstico favorável, o CG associado ao EBV deve ser considerado como uma nova entidade patológica (Chen *et al.*, 2012).

Para o EBV a frequência encontrada no presente estudo foi de 9,6%, o que corrobora os estudos realizados nos estados de Ceará e São Paulo que encontraram valores de frequência próximos a este estudo, quais sejam 8,5% e 11,3% respectivamente (Lima *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2004) . Estes resultados também estão de acordo com a literatura mundial que refere que a frequência de EBV em CG varia em torno de 10% nas diversas populações do planeta (Akiba *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012). Nota-se porém, que as frequências encontradas no Brasil foram maiores que a frequência de 5,1% encontrada nos EUA por Truong *et al.* (2009).

Quando se associou os casos positivos para *H. pylori* (*urease*), para a cepa *cagA* de *H. pylori* e para o EBV, com a localização cárdia e não cárdia das lesões (tabela 5), observou-se uma tendência estatística ( $p=0,079$ ) para a associação da presença de *H. pylori* nos tumores localizados na cárdia, visto que os tumores com localização não-cárdia apresentaram fator de proteção relativo (OR) de 0,297; ou 70,3% menos chance de estar relacionado a *H. pylori*. Estes achados são contrastantes com os referidos na literatura mundial, que têm apresentado uma relação entre a presença de *H. pylori* e a localização não-cárdia dos tumores (Crew e Neugut, 2006).

Quando se associou os casos positivos para *H. pylori* (*urease*), para a cepa *cagA* de *H. pylori* e para o EBV, com a classificação histológica dos tumores (tabela 6), observou-se significância estatística ( $p=0,007$  e  $p=0,008$ ) para a associação entre o tipo histológico dos tumores com a presença da cepa *cagA* de *H. pylori*. Os presentes resultados demonstram que o tipo difuso apresenta um fator de proteção relativo (OR) de 0,348

quando comparado ao tipo intestinal, ou seja, os pacientes que apresentam positividade para *cagA* que é a cepa mais virulenta de *H. pylori*, tem 65,2% menos chance de desenvolver o adenocarcinoma do tipo difuso, e em contrapartida tem mais chance de desenvolver o tipo intestinal. Estudos clínico-patológicos tem demonstrado esta relação entre o adenocarcinoma do tipo intestinal e a cepa *cagA*, pois os mesmos sugerem que os fatores ambientais, como infecções e dieta, tem maior influência na carcinogênese do tipo intestinal que no tipo difuso e de modo inverso os fatores genéticos têm maior influência no câncer do tipo difuso (Smith *et al.*, 2006; Milne *et al.*, 2009).

O diagnóstico tempestivo é atualmente um dos principais desafios na luta contra o câncer gástrico, pois a descoberta da doença é normalmente realizada tardiamente, tornando as opções terapêuticas escassas com uma conseqüente alta taxa de mortalidade (Vannella *et al.*, 2012).

Em Belém-PA, um estudo da taxa de mortalidade revelou magnitudes bastante elevadas de 15,8 a 27,2/100.000 habitantes, comparativamente a outras capitais brasileiras e países (Resende *et al.*, 2006).

Quando, no presente estudo, se associou as variáveis *H. pylori* (*urease*), cepa *cagA* de *H. pylori* e EBV, com o estadiamento dos tumores (tabela 7), não houve significância estatística. É de se notar, contudo, a alta frequência observada para estas variáveis nos estádios III e IV da doença (82,4%; 85,7% e 100% respectivamente), e o número total de pacientes (N=103) encontrados nestes estádios, que correspondem a uma frequência de 82,4%, do total de pacientes estudados.

Estas frequências corroboram as altas taxas de mortalidade encontradas em Belém e demonstram que, em sua maioria, o diagnóstico é realizado nos estádios mais avançados da doença, fato que diminui a possibilidade de cura e a taxa de sobrevivência dos pacientes,

especialmente em áreas consideradas de alto risco como o norte do Brasil (Burbano *et al.*, 2006).

O fator de virulência da *H. pylori* melhor caracterizado é a *cag*-PAI, que permite que a proteína CagA seja injetada no citosol da célula epitelial gástrica. A fosforilação desta proteína induz a secreção de IL-8 e está associada com a redução da apoptose. Os efeitos de CagA nas células epiteliais a associam com a carcinogênese do adenocarcinoma gástrico, e é comum observar uma alta prevalência das cepas *cagA*-positivas nestes tumores (Wroblewski *et al.*, 2010).

A relação entre a cepa *cagA* e CG também foi evidenciada no presente trabalho, onde demonstrou-se uma frequência 76,4% para *cagA* nos pacientes *urease* positivos, e na correlação entre a *urease* e os tumores *cagA* positivos, obteve-se significância estatística ( $p=0,000$ ). Verificou-se que os casos positivos para a *urease* apresentam um fator de risco relativo (O.R.) de 4,231 para *cagA* positivo, ou seja, os pacientes com adenocarcinoma gástrico positivos para *urease* tem 423,1% a mais de chance de apresentar positividade para *cagA*, que é a cepa mais virulenta de *H. pylori* (tabela 8 e Figura 16).

Cavalcante *et al.* (2012), encontraram, em uma população também considerada de alto risco, no nordeste do Brasil, uma frequência ainda maior que a do presente estudo, para tumores *cagA* positivos (96,7%). Este mesmo estudo também mostrou que houve significância estatística quando se associou *cagA* com *H. pylori*, e corroborou os presentes resultados que demonstraram o papel desta cepa na carcinogênese gástrica.

Poucos estudos tem investigado a interação entre a infecção por EBV e *H. pylori* no câncer gástrico, em populações do Brasil e também de outros países. No Brasil, Lima *et al.* (2008) e Ferrasi *et al.* (2010), demonstraram para o EBV, frequências próximas àquelas do presente trabalho, porém não encontraram significância estatística ao realizar a associação com a *Helicobacter pylori*.

Analisando-se a associação, nos presentes resultados, dos casos positivos para *urease*, com a presença concomitante do EBV, também não foi encontrada significância estatística (tabela 9). É necessário ressaltar, entretanto, que em contraste com os trabalhos acima citados, o presente estudo foi o único a encontrar, em todos os casos positivos para EBV (N=12) a frequência de 100% de positividade para *urease*. Estes resultados sugerem uma relação entre a *H. pylori* e o EBV na carcinogênese gástrica, pois existem evidências de que a infecção por *H. pylori* em casos de gastrite atrófica crônica com subsequente metaplasia intestinal, aumenta a suscetibilidade do epitélio da mucosa gástrica ao EBV, e o vírus, facilita então o processo de carcinogênese gástrica (Yanai *et al.*, 1997). O trabalho de Shukla *et al.* (2011) demonstrou ainda, em indivíduos com doenças gastrointestinais positivos para *H. pylori*, uma tendência para cargas virais mais elevadas de EBV, sugerindo um papel desta bactéria na conversão do EBV para a fase lítica.

O significado destes achados é importante e permite inferir que a interação entre a *H. pylori* e o EBV pode apresentar um mecanismo sinérgico na patogênese de uma significativa parcela das neoplasias gástricas.

Os presentes resultados permitem ainda sugerir que o diagnóstico concomitante de *H. pylori* e EBV em adenocarcinoma gástrico, seja considerado um fator prognóstico desfavorável neste tipo de neoplasia, contudo futuros estudos são necessários para corroborar esta ilação.

## 6 CONCLUSÕES

A análise do presente trabalho em relação à prevalência e associação da infecção por *Helicobacter pylori* e do vírus de Epstein-Barr em adenocarcinoma gástrico, na população selecionada na região norte do Brasil, permitiu concluir que:

- 1- A prevalência encontrada para a presença de *H. pylori* em adenocarcinoma gástrico foi de 88% e foi considerada elevada quando comparada a estudos anteriores na região norte.
- 2- A prevalência encontrada para a presença de EBV em adenocarcinoma gástrico foi de 9,6% e é semelhante a taxas encontradas em outros estados do Brasil.
- 3- Identificou-se para adenocarcinoma gástrico, o maior acometimento de pacientes do sexo masculino (68%) e de faixa etária acima de 50 anos (78%), o que está de acordo com os achados da literatura mundial.
- 4- Os pacientes com positividade para a cepa mais virulenta de *H. pylori* (*cagA*), apresentaram um risco relativo aumentado para desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal.
- 5- A frequência encontrada para pacientes nos estádios III e IV de câncer gástrico foi de 82,4%, evidenciando que o diagnóstico é geralmente realizado tardiamente.
- 6- Os casos de adenocarcinoma gástrico positivos para *urease*, apresentaram um fator de risco relativo, maior que quatro vezes, para a presença da cepa *cagA* de *H. pylori*.
- 7- Não houve significância estatística para a associação entre a infecção por *H. pylori* e o EBV em adenocarcinoma gástrico na população estudada.

- 8- Os casos de adenocarcinoma positivos para EBV, apresentaram positividade de 100% para *urease*, sugerindo uma possível atuação sinérgica na carcinogênese gástrica.
- 9- Evidenciou-se a necessidade da realização de estudos mais abrangentes que possam avaliar um maior número amostral de casos de câncer gástrico associado ao EBV e a *H. pylori*, e de câncer gástrico associado ao EBV, porém negativos para a *H. pylori*, a fim de analisar o real sinergismo entre a *H. pylori* e o EBV, assim como investigar o verdadeiro papel causal deste vírus na carcinogênese gástrica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, J.L., GONZALES, M.I., TOPALIAN, S.L. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. **BioTechniques**, 36 (1), p.84-86, 88, 90-91, 2004.

AKIBA, S., KORIYAMA, C., HERRERA-GOEPFERT, R., EIZURU, Y. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: Epidemiological and clinicopathological features. **Cancer Sci.**, 99(2), p.195–201, 2008.

AKIRA, S., UEMATSU, S., TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, 124(4), p.783-801, 2006.

ALPIZAR-ALPIZAR, W., PEREZ-PEREZ, G.I., UNE, C., CUENCA, P., SIERRA, R. Association of interleukin-1B and interleukin-1RN polymorphisms with gastric cancer in a high-risk population of Costa Rica. **Clin. Exp. Med.**, 5:169-76, 2005.

AMEDEI, A., CAPPON, A., CODOLO, G., CABRELLE, A. et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. **J. Clin. Invest.**, 116, p.1092–1101, 2006.

ANDO, T., GOTO, Y., MAEDA, O., WATANABE, O., ISHIGURO, K., GOTO, H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. **World. J. Gastroenterol.**, 12(2), p.181-186, 2006.

ANTONIOLI, D.A. Precursors of gastric carcinoma: a critical review with a brief description of early (curable) gastric cancer. **Hum. Pathol.**, 25, p.994-1005, 1994.

ARREGI, M.M.U., FÉRRER, D.P.C., ASSIS, E.C.V., et al. Perfil clínico-epidemiológico das neoplasias de estômago atendidas no Hospital do Câncer do Instituto do Câncer do Ceará, no período de 2000-2004. **Rev. Bras. Cancerol.**, 55(2), p.121-128, 2009.

ARVANITIS, C., FELSHER, D. W. Conditionally MYC: insights from novel transgenic models. **Cancer Lett.**, 226(2), p.95-99, 2005.

BABCOCK, G.J., DECKER, L.L., VOLK, M., THORLEY-LAWSON, D.A. EBV persistence in memory B cells in vivo. **Immunity**, 9, 395–404, 1998.

BACCHI, M.M., BACCHI, C.E., ALVARENGA, M., MIRANDA, R., CHEN, Y.Y., WEISS, L.M. Burkitt's lymphoma in Brazil: strong association with Epstein-Barr virus. **Mod. Pathol.**, 9(1), p.63-67, 1996.

BASSO, D., ZAMBON, C.F., LETLEY, D.P., STRANGES, A. et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. **Gastroenterology**, 135, p.91-9, 2008.

BEALES, I.L., CALAM, J. Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. **Gut**, 42, p.227-234, 1998.

BOUVARD, V., BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE, Y., SECRETAN, B., GHISSASSI, F.E., TALLAA, L.B., et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. **Lancet Oncol.**, 10, 321-322, 2009.

BURBANO, R.R., ASSUMPÇÃO, P.P., LEAL, M.F., CALCAGNO, D.Q., GUIMARÃES, A.C., KHAYAT, A.S., TAKENO, S.S., CHEN, E.S., SMITH, M.A.C. *C-MYC* Locus Amplification as Metastasis Predictor in Intestinal-type Gastric Adenocarcinomas: CGH Study in Brazil. **Anticancer Res.**, 26(4B), p. 2909-2914, 2006.

BURKE, A.P., YEN, T.S., SHEKITKA, K.M., SOBIN, L.H. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. **Mod. Pathol.**, 3, p.377-380, 1990.

BURKITT, D. A children's cancer dependent on climatic factors. **Nature**, 194, p.232-234, 1962.

CALCAGNO, D.Q., LEAL, M.F., SEABRA, A.D., KHAYAT, A.S., CHEN, E.S., DEMACHKI, S., ASSUMPÇÃO, P.P., FARIA, M.H.G., RABENHORST, S.H.B., FERREIRA, M.V.P., SMITH, M.A.C., BURBANO, R.R. Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, *C-MYC* amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **World J. Gastroenterol.**, 12(38), p.6207-6211, 2006.

CARL-MCGRATH, S., EBERT, M., RÖCKEN, C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. **Cancer Ther.**, v.5, p.877-894, 2007.

CARNEIRO, F. et al. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. **J. Pathol.**, 203(2), p.681-687, 2004.

CARNEIRO F, OLIVEIRA C, SURIANO G, SERUCA R. Molecular pathology of familial gastric cancer, with an emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. **J. Clin. Pathol.**, 61, p.25-30, 2008.

CAVALCANTE, M.Q.F., SILVA, C.I.S., BRAGA-NETO, M.B. et al. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in patients from northeastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 107(4), p.561-563, 2012.

CHANG, M.S., KIM, W.H. Epstein-Barr Virus in Human Malignancy: A Special Reference to Epstein-Barr Virus associated Gastric Carcinoma. **Cancer Res. Treat.**, 37(5), p.257-267, 2005.

CHANG, Y.J., WU, M.S., LIN, J.T., CHEN, C.C. *Helicobacter pylori*-induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. **J. Immunol.**, 175(12), p.8242-8252, 2005.

CHEN, J.N., HE, D., TANG, F., SHAO, C.K. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: a newly defined entity. **J. Clin. Gastroenterol.**, 46(4), p.262-271, 2012.

CHEN, M.R. Epstein–Barr virus, the immune system, and associated diseases. **Front. Microbiol.**, 2(5), p.1-5, 2011.

CHEN, S.Y. et al. Modification effects of GSTM1, GSTT1 and CYP2E1 polymorphisms on associations between raw salted food and incomplete intestinal metaplasia in a high-risk area of stomach cancer. **Int. J. Cancer**, 108(4), p.606-612, 2004.

CHIARAVALLI, A.M., KLERSY, C., VANOLI, A., FERRETTI, A., CAPELLA, C., SOLCIA E. Histotype-based prognostic classification of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.** 18(9), p.896-904, 2012.

CHONG, J.M., SAKUMA, K., SUDO, M., *et al* . Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. **Cancer Sci.**, 94(1), p.76-80, 2003.

CLAYTON, C.L., KLEANTHOUS, H., COATES, P.J., MORGAN, D.D., TABAQCHALI, S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 30, p.192-200, 1992.

CONNOLLY, S.A., JACKSON, J.O., , JARDETZKY, T., LONGNECKER, R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nat. Rev. Microbiol.**, 9(5), p.369–381, 2011.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-- First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res.**, 52, p.6735-6740, 1992.

CORREA, P. Gastric neoplasia. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, 4, p.463-470, 2002.

COVACCI, A., CENSINI, S., BUGNOLI, M., PETRACCA, R., BURRONI, D., et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. **Proc Natl Acad Sci.**, 90(12), p.5791-5795, 1993.

CRAANEN, M.E et al. Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. **Gut** 33(1), p.16-20, 1992.

CREW, K.D., NEUGUT, A.I. Epidemiology of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, 12(3), p.354-362, 2006.

DEKKER, W., OP DEN ORTH, J.O. Early gastric cancer. **Radiol Clin.**, 46, p.115-129, 1977.

DELBRIDGE, L.M., O'RIORDAN, M.X. Innate recognition of intracellular bacteria. **Curr Opin Immunol.**, 19(1), p.10-16, 2007.

DERAKHSHAN, M.H. et al. Oesophageal and gastric intestinal-type adenocarcinomas show the same male predominance due to a 17 year delayed development in females. **Gut**, 58(1), p.16-23, 2009.

DICKEN, B.J., BIGAN,D.L., CASS,C., et al. Gastric Adenocarcinoma: review and considerations for future directions. **Ann. Surg.**, v.241, n. 1, p.27-39, 2005.

DROTAR, M.E., SILVA, S., BARONE, E., CAMPBELL, D., TSIMBOURI, P., JURVANSU, J., BHATIA, P., KLEIN, G., WILSON, J.B. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 and Myc cooperate in lymphomagenesis. **Int. J. Cancer** 106(3), p.388-395, 2003.

DUARTE, M.C., BABETO, E. et al. Expression of TERT in precancerous gastric lesions compared to gastric cancer. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, vol. 44(2), p.100-104, 2011.

EATON, K.A., KRAKOWKA, S. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. **Infect. Immun.**, 62, p.3604-3607, 1994.

EBERT, M.P., KRUGER, S., FOGERON, M.L. et al. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. **Proteomics**, 5, p.1693-1704, 2005.

EBERT, M.P., MALFERTHEINER, P. Pathogenesis of sporadic and familial gastric cancer-implications for clinical management and cancer prevention. **Aliment Pharmacol Ther.**, 16, p.1059-66, 2002.

EPSTEIN, M.A., HENLE, G., ACHONG, B.G., BARR, Y.M. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **J. Exp. Med.**, 121, p.761-70, 1965.

ESPEJO, E.J., NAVARRETE,S.J. Classification of stomach adenocarcinomas. **Rev Gastroenterol Peru**, 23, p.199-212, 2003.

EVERHART, J.E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol Clin North Am.**, 29, p.559-578, 2000.

FERRASI, A.C., PINHEIRO, N.A., RABENHORST, S.H.B., et al. *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: Methylation status and microsatellite instability. **World J. Gastroenterol.**, 16(3), p.312-319, 2010.

FIGUEIREDO, C., MACHADO, J.C., PHAROAH, P., SERUCA, R., et al. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.** , 94, p.1680-7, 2002.

FRITZ, J.H., FERRERO, R.L., PHILPOTT, D.J., GIRARDIN, S.E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat. Immunol.**, 7(12), p.1250-1257, 2006.

FUENTES-PANANÁ,E., CARMOLINGA-PONCE,M., MALDONADO-BERNAL, C. Infección, inflamación y cáncer gástrico. **Salud Publica Mex.**, v.51, p.427-433, 2009.

FUKATA, M., MICHELSEN, K.S., ERI, R., THOMAS, L.S., HU, B., LUKASEK, K. et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 288(5), p.G1055-1065, 2005.

GERAMINEJAD, P., MEMAR, O., ARONSON, I., RADY, P. L., HENGEE, U., TYRING, S. K. Kaposi's sarcoma and other manifestations of human herpesvirus 8. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 47, p. 641-655, 2002.

GONZALEZ, C. A. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Public Health Nutr.**, 9, p.124-126, 2006.

GORE, R. Gastrointestinal cancer. **Radiol. Clin. North Am.**, 35, p.295- 310, 1997.

GOSEKI, N., TAKIZAWA, T., KOIKE, M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. **Gut**, 33, p.606-612, 1992.

GREEN, D., PONCE DE LEON, S., LEON-RODRIGUEZ, E., et al. Adenocarcinoma of the stomach: univariate and multivariate analysis of factors associated with survival. **Am. J. Oncol.**, 25, p.84-89, 2002.

GULLEY, M.L. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus related diseases. **J. Mol. Diagn.**, 3, p.1-10, 2001.

GULLEY ML, GLASER SL, CRAIG FE, BOROWITZ M, MANN RB, SHEMA SJ, AMBINDER RF: Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. **Am. J. Clin. Pathol.** , 117, p.259-267, 2002.

GULLEY, M., TANG, W. Laboratory assays for Epstein-Barr related disease. **J. Mol. Diagn.**, 10: 279-292, 2008.

HAMILTON, J.P., MELTZER, S.J. A review of the genomics of gastric cancer. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, 4, p.416-425, 2006.

HAMILTON, S.R., AALTONEN, L.A. **Pathology and genetics of tumours of the digestive system.** 1<sup>a</sup> ed. Lyon: IARC Press, 2000. 314p. Disponível em: <[http://www.iranpath.org/Books/Tumors\\_of\\_GI\\_WHO.pdf](http://www.iranpath.org/Books/Tumors_of_GI_WHO.pdf)>. Acesso em: 10 março 2012.

HAN J, ULEVITCH RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. **Nat. Immunol.**, 6(12), p.1198-1205, 2005.

HANSSON, L.E., NYREN, O., HSING, A.W., BERGSTROM, R., JOSEFSSON, S., CHOW, W.H, FRAUMENI, J.F. Jr., ADAMI, H.O. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. **N. Engl. J. Med.**, 335, p.242-249, 1996.

HATAKEYAMA, M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. **Nat. Rev. Cancer**,4, p.688-94, 2004.

HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **J. Gastroenterol.**, 44, p.239-248, 2009.

HECHT, J., CIBAS, E., KUTOK, J. Fine-needle aspiration cytology of lymphoproliferative disorders in the immunosuppressed patient: the diagnostic utility of *in situ* hybridization for Epstein-Barr virus. **Diagn Cytopathol.**, 26, 360–365, 2002.

HENLE, G., HENLE, W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. **J. Bacteriol.**, 91, p.1248–1256, 1966.

HSIEH, W.S., LEMAS, M.V., AMBINDER, R.F. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. **Transpl. Infect. Dis.** 1(3):204-12, 1999.

IARC - Cancer Databases and Other Resources. International Agency for Research on Cancer (IARC) page. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em 28 janeiro 2005.

IARC - International Agency for Research on Cancer (2012). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>>. Acesso em 20 março 2012.

ICTV (2011). Lynfocryptovirus. In: “Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2011). Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier Academic Press”. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version2011>>. Acesso em: 20 novembro 2011.

IMAI, S., NISHIKAWA, J., TAKADA, K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. **J Virol.**, 72, p.4371–4378, 1998.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (2012). Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>>. Acesso em: 06 junho 2012.

ISHIHARA, S., RUMI, M.A., KADOWAKI, Y., ORTEGA-CAVA, C.F., YUKI, T., YOSHINO, N. et al. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. **J. Immunol.**, 173(2), p.1406-1416, 2004.

JAKSZYN, P. et al. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. **Carcinogenesis**, 27(7), p. 1497-501, 2006.

JAVIER, R.T., BUTEL, J.S. The History of Tumor Virology. **Cancer Res.**, 68(19), p.7693-7706, 2008.

KHAYAT, A.S. Estudo do gene TP53 em adenocarcinoma gástrico no estado do Pará: polimorfismo no códon 72, metilação, imunohistoquímica e hibridação *in situ* por fluorescência. 2007, 94f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Pará, 2007.

KIEFF, E., DAMBAUGH, T., HELLER, M., KING, W., CHEUNG, A., VAN SANTEN, V., HUMMEL, M., BEISEL, C., FENNEWALD, S., HENNESSY, K., HEINEMAN, T. The biology and chemistry of Epstein-Barr virus. **J. Infect. Dis.**, 146(4), p.506-517, 1982.

KOSHIOL, J., QIAO, Y.L., MARK, S.D. *et al.* Epstein–Barr virus serology and gastric cancer incidence and survival. **Br. J. Cancer**, 97, p.1567 – 1569, 2007.

KUCK, D., KOLMERER, B., IKING-KONERT, C., KRAMMER, P.H., STREMMEL, W., RUDI, J. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. **Infect. Immun.**, 69, p.5080-5087, 2001.

KWON, S.J. Evaluation of the 7th UICC TNM Staging System of Gastric Cancer. **J. Gastric Cancer**, 11(2), p.78-85, 2011.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 64, p.31-49, 1965.

LAWRENCE, T., WILLOUGHBY, D.A., GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, 2(10), p.787-795, 2002.

LEE, H.S., CHANG, M.S., YANG, H.K., LEE, B.L., KIM, W.H. Epstein-barr virus positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with epstein-barr virus negative carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, 10, p.1698-1705, 2004.

LELLO, E., FURNES, B., EDNA, T.H. Short and long-term survival from gastric cancer. A population-based study from a county hospital during 25 years. **Acta Oncol.**, 46, p.308-315, 2007.

LIMA, M.A.P., FERREIRA, M.V.P., BARROS, M.A.P., PARDINI, M.I.M.C., FERRASI, A.C., RABENHORST, S.H.B. Detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV) em adenocarcinomas gástricos procedentes dos estados do Ceará e São Paulo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 47(2), p. 171-179, 2011.

LIMA, M.A.P., RABENHORST, S.H.B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **Rev. Bras. Cancerol.**, 52, p.87-96, 2006.

LIMA, V.P., LIMA, M.A.P., ANDRÉ, A.R., FERREIRA, M.V.P., BARROS, M.A.P., RABENHORST, S.H.B. *H. pylori* (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: Correlation with *p53* mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. **World J. Gastroenterol.**, 14(6), p. 884-891, 2008.

LI, Q., VERMA, I.M. NF-kappa B regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, 2(10), p.725-734, 2002.

LOPES, L. F., BACCHI, M.M. *et al.* Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo state, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37(11), p. 1707-1712, 2004.

LOUIS, S.F., VERMOLEN, B.J. *et al.* C-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102(27), p.9613-9618, 2005.

- MACDONALD, J.S. Gastric cancer: chemotherapy of advanced disease. **Hematol. Oncol.**, 10, p.37-42, 1992.
- MACDONALD, J., SMALLEY, S., BENEDETTI, J., et al. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. **N. Engl. J. Med.**, 345, p.725-729, 2001.
- MARCHET, A., MOCELLIN, S., AMBROSI, A., DE, M.G., DI, L.A., MARRELLI, D. et al. On Behalf Of The Italian Research Group For Gastric Cancer Study Gircg (2007) The prognostic value of N-ratio in patients with gastric cancer: Validation in a large, multicenter series. **Eur. J. Surg. Oncol.**, 34, p.159-65, 2007.
- MARSHALL, B.J., WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, 1(8390), p.1311-1315, 1984.
- MARSHALL, B. Helicobacter connections. **Chem. Med. Chem.**, 1, p.783-802, 2006.
- MERRY, A.H. et al. Body mass index, height and risk of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia: a prospective cohort study. **Gut**, 56(11), p.1503-1511, 2007.
- MICHELOW, P., WRIGHT, C., PANTANOWITZ, L. A Review of the Cytomorphology of Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies. **Acta Cytol.**, 56, p.1-14, 2012.
- MILNE, A.N., CARNEIRO, F., MORAIN, C.O., OFFERHAUS, G.J.A. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer. **Hum. Genet.**, 126, p.615-628, 2009.
- MING, S.C. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. **Cancer**, 39, p.2475-2485, 1977.
- MONTERO-VEGA, M.T., ANDRÉS-MARTÍN, A.D. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. **Allergol. Immunopathol.**, 36(6), p.347-357, 2008.
- MURATA-KAMIYA, N., KIKUCHI, K., HAYASHI, T., HIGASHI, H., HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. **Cell. Host. Microbe**, 7, p.399-411, 2010.
- MURRAY P.G., YOUNG, L.S. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. **Expert Rev. Mol. Med.**, 3(28), p.1-20, 2001.
- NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J. Gastroenterol. Oncol.**, 4(7), p. 156-169, 2012.

NAITO, Y., YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, 33, p.323-336, 2002.

NILLER, H.H., SALAMON, D., ILG, K., KOROKNAI, A. *et al.* The in vivo binding site for oncoprotein c-Myc in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoding RNA (EBER) 1 suggests a specific role for EBV in lymphomagenesis. **Med. Sci. Monit.**, 9(1), p.HY1-9, 2003.

NOBILI, S., BRUNO, L. *et al.* Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, 17(3), p.290-299, 2011.

ODUMADE, O.A., HOGQUIST, K.A., BALFOUR JR, H.H. Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, 24(1), p. 193–209, 2011.

OHNISHI, N., YUASA, H., TANAKA, S., SAWA, H., MIURA, M., MATSUI, A., HIGASHI, H., M. MUSASHI, K. IWABUCHI, M. SUZUKI, G. YAMADA, T. AZUMA, AND M. HATAKEYAMA. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 105, p.1003–1008, 2008.

OHYAUCHI, M., IMATANI, A., YONECHI, M., *et al.* The polymorphism interleukin 8-251 A/T influences the susceptibility of *Helicobacter pylori* related gastric diseases in the Japanese population. **Gut**, 54, p.330-5, 2005.

OLIVEIRA, C., SERUCA, R., CARNEIRO, F. Genetics, pathology, and clinics of familial gastric cancer. **Int. J. Surg. Pathol.**, 14, p.21-33, 2006.

ORLANDO, R.C. Mechanisms of epithelial injury and inflammation in gastrointestinal diseases. **Rev. Gastroenterol. Disord.**, 2 Suppl 2, S2-S8, 2002.

OSATO, T., IMAI, S. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **Semin. Cancer Biol.**, 7(4), p.175-82, 1996.

OSAWA, T., CHONG, J.M., SUDO, M., SAKUMA, K., UOZAKI, H., SHIBAHARA, J., NAGAI, H., FUNATA, N., FUKAYAMA, M. Reduced expression and promoter methylation of p16 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Jpn. J. Cancer Res.**, 93(11), p.1195-200, 2002.

PARKIN, D.M., BOYD, L., WALKER, L.C. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. Summary and conclusions. **Br. J. Cancer**, 105 (S2), p.S77-S81, 2011.

PARSONNET, J., FRIEDMAN, G.D., ORENTREICH, N., VOGELMAN, H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, 40, p.297-301, 1997.

PARSONNET, J., HANSEN, S., RODRIGUEZ, L. et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. **N. Engl. J. Med.**,330: 1267-1271, 1994.

PEEK, R.M. Jr, THOMPSON, S.A., DONAHUE, J.P., THAM, K.T., ATHERTON, J.C., BLASER, M.J., MILLER, G.G. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, 110, p.531-544, 1998.

PEREIRA, L.P.L.B., WAISBERG, J., ANDRÉ, E.A. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric cancer. **Arq. Gastroenterol.**, 38(4), p.240-246, 2001.

PIAZUELO, M.B., EPPLEIN, M., CORREA, P. Gastric câncer: An infectious disease. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, 24(4), p.853-869, 2010.

RAAB-TRAUB, N., RAJADURAI, P. et al. Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. **J. Virol.**, 65(12), p.7032-7036, 1991.

RESENDE, A.L.S., MATTOS, I.E., KOIFMAN, S. Mortalidade por câncer gástrico no Estado do Pará, 1980-1997. **Arq. Gastroenterol.**, 43(3), p.247-252, 2006.

RHEAD, J.L., LETLEY, D. P., MOHAMMADI, M., HUSSEIN, N., MOHAGHEGHI, M.A., ESHAGH HOSSEINI, M., ATHERTON, J.C. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. **Gastroenterology**, 133, p.926-936, 2007.

ROESLER, B.M., COSTA, S.C.B., ZEITUNE, J.M.R. Eradication Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: Its Importance and Possible Relationship in Preventing the Development of Gastric Cancer. **ISRN Gastroenterol.**, 12, p.01-09, 2012.

SATOH, S., KAWASHIMA, K., MATSUMOTO, S., HASEGAWA, S., OKABE, H., NOMURA, A., YOSHIBAYASHI, H., WATANABE, G., NAGAYAMA, S., FUKUSHIMA, M., SAKAI, Y. Retrospective evaluation of sequential outpatient chemotherapy for advanced gastric cancer. **Chemotherapy**, 53, p.226-232, 2007.

SCHMAUSSER, B., ANDRULIS, M., ENRICH, S., LEE, S.K., JOSEPHANS, C., MÜLLER-HERMELINK, H.K. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. **Int. J. Med. Microbiol.**, 295, p.179-185, 2005.

SCHOTTENFELD, D., BEEBE-DIMMER, J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. **CA Cancer J Clin**, 56(2):p.69-83, 2006.

SEGAL, E.D., LANGE, C., COVACCI, A., TOMPKINS, L.S., FALKOW, S. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94, p.7595-7599, 1997.

SELGRAD, M., MALFERTHEINER, P., FINI, L., GOEL, A., BOLAND, C.R., RICCIARDIELLO. The role of viral and bacterial pathogens in gastrointestinal cancer. **J. Cell. Physiol.**, 216(2), p.378-388, 2008.

SHANG,J., PENA, A.S. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World J Gastroenterol.**, 11, p.4131-4139, 2005.

SHIBATA, D., TOKUNAGA, M., UEMURA, Y., SATO, E., TANAKA, S., WEISS, L.M. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. **Am. J. Pathol.**, 139(3), p.469-474, 1991.

SHIBATA, D., WEISS, L.M. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma. **Am. J. Pathol.**, 140(4), p.769-774, 1992.

SHUKLA, S.K., PRASAD, K.N. *et al.* Epstein-Barr virus DNA load and its association with *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal diseases. **Braz J Infect Dis.**, 15(6), p.583-590, 2011.

SMITH M.G., HOLD, G.L., TAHARA, E., EL-OMAR, E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.** ,12, p.2979-2990, 2006.

SOBIN,L.H. E WITTEKIND, C.H., (eds.) **TNM: classificação de tumores malignos.** 6 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

SONGUN, I., VAN, D. V., ARENDS, J.W., BLOK, P., GROND, A.J., OFFERHAUS, G.J., HERMANS, .J, VAN KRIEKEN, J.H. Classification of gastric carcinoma using the Goseki system provides prognostic information additional to TNM staging. **Cancer**, 85, p.2114-2118, 1999.

STEIN, M., RAPPUOLI, R., COVACCI, A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97, p.1263-1268, 2000.

SUDO, M., CHONG, J.M., SAKUMA, K., USHIKU, T., UOZAKI, H., NAGAI, H., FUNATA, N., MATSUMOTO, Y., FUKAYAMA, M. Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Int. J. Cancer** 109(2), p.194-199, 2004.

SUERBAUM, S. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. **Int. J. Med. Microbiol.**, 290, p.175-181, 2000.

SUERBAUM, S., MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N. Engl. J. Med.**, 347(15), p.1175-1186, 2002.

SUGIURA, M., IMAI, S., TOKUNAGA, M., KOIZUMI, S., UCHIZAWA, M., OKAMOTO, K., OSATO, T. Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. **Br. J. Cancer** 74(4), p.625-31, 1996.

SUNG, J.J., LEUNG, W.K., GO, M.Y., TO, K.F., CHENG, A.S., NG, E.K. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. **Am. J. Pathol.**, 157(3), p.729-735, 2000.

TAKADA, K., NANBO, A. The role of EBERs in oncogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, 53, p.255-261, 2001.

TANAKA, K., KIYOHARA, Y., KATO, I., MATSUMOTO, T., YAMAGATA, H., KUBO, M., TANIZAKI, Y., OKUBO, K., NAKAMURA, H., IWAMOTO, H., NAKAYAMA, K., IIDA, M. Incidence and prognosis of gastric cancer in a population-based cohort survey: the Hisayama study. **Scand. J. Gastroenterol.**, 39, p.459-463, 2004.

TANG, W., MORGAN, D.R., MEYERS, M.O., et al. Epstein-barr virus infected gastric adenocarcinoma expresses latent and lytic viral transcripts and has a distinct human gene expression profile. **Infect. Agent. Cancer**, 7(1), p.21, 2012. [Epub ahead of print]

THOMAZINI, C.M., PINHEIRO, M.A., et al. Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas cagA e vacA em pacientes com câncer gástrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 42(1), p. 25-30, 2006.

THORLEY-LAWSON, D.A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, 1(1), p.75-82, 2001.

TRUONG, C.D., FENG, W., LI, W. et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, 28(1), p.14-22, 2009.

TSUCHIYA, S. Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 44(3), p.227-238, 2002.

UEMURA, N., OKAMOTO, S., YAMAMOTO, S., MATSUMURA, N., YAMAGUCHI, S., YAMAKIDO, M., TANIYAMA, K., SASAKI, N., SCHLEMPER, R.J. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med.**, 345, p.784-789, 2001.

UL - UNIVERSITY OF LEICESTER 2012. Disponível em:<[http://www.le.ac.uk/pa/teach/va/anatomy/case6/6\\_3a.html](http://www.le.ac.uk/pa/teach/va/anatomy/case6/6_3a.html)>. Acesso em: 25 fevereiro 2012.

UNO, K., KATO, K., ATSUMI, T., SUZUKI, T., YOSHITAKE, J., MORITA, H., et al. Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 293(5), p.G1004-G1012, 2007.

UOZAKI, H., FUKAYAMA, M. Epstein-Barr Virus and Gastric Carcinoma - Viral Carcinogenesis through Epigenetic Mechanisms. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, 1, p.198-216, 2008.

VANNELLA, L., LAHNER, E., ANNIBALE, B. Risk for gastric neoplasias in patients with chronic atrophic gastritis: A critical reappraisal. **World J. Gastroenterol.**, 18(12), p.1279-1285, 2012.

VARMUS, H. The new era in cancer research. **Science**, 312, p.1162-1165, 2006.

VELÁZQUEZ, E., PEIX, A., GOMES-ALONSO, A. Microorganisms and cancer: Scientific evidence and new hypotheses. **Cir. Esp.**, 89(3), p. 136-144, 2011.

VIALA, J., CHAPUT, C., BONECA, I.G., CARDONA, A. et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **Nat. Immunol.**, 5, p.1166–1174, 2004.

WASHINGTON, K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. **Ann Surg Oncol**, 17, p.3077-3079, 2010.

WATANABE, T., ASANO, N., FICHTNER-FEIGL, S. et al. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. **J. Clin. Invest.**, 120, p.1645–1662, 2010.

WATANABE, T., TADA, M., NAGAI, H., SASAKI, S., NAKAO, M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. **Gastroenterology**, 115(3), p.642-648, 1998.

WEEKS, D.L., ESKANDARI, S., SCOTT, D.R., SACHS, G. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. **Science**, 287, p.482-485, 2000.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>>. Acesso em: 12 março 2012.

WILSON, K.T., CRABTREE, J.E. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. **Gastroenterology**, 133, p.288-308, 2007.

WROBLEWSKI, L.E., PEEK JR, R.M., WILSON, K.T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. **Clin. Microbiol. Rev.**, 23(4), p.713-739, 2010.

WVC - WEST VALLEY COLLEGE 2012. Disponível em: <<http://instruct.westvalley.edu/granieri/biology103coursepage.html>>. Acesso em: 07 junho 2012.

YANAI, H., TAKADA, K., SHIMIZU, N. et al. Epstein-Barr virus infection in non-carcinomatous gastric epithelium. **J. Pathol.**, 183, p.293-298, 1997.

YANG, D., HANDIFAR, A., LENZ, C. et al. Survival of metastatic gastric cancer: Significance of age, sex and race/ethnicity. **J. Gastrointest. Oncol.**, 2(2), p.77-84, 2011.

YATES, J.L., WARREN, N., SUGDEN, B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. **Nature**, 313, p. 812–15, 1985.

YOKOTA, T., ISHIYAMA, S., SAITO, T., TESHIMA, S., NARUSHIMA, Y., MURATA, K., IWAMOTO, K., YASHIMA, R., YAMAUCHI, H., KIKUCHI, S. Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. **Scand. J. Gastroenterol.**, 39, p.380-384, 2004.

YUASA, Y. Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, 3, p.592-600, 2003.

YUASA, Y. et al. DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. **Int. J. Cancer.**, 124(11), p.2677-2682, 2009.

ZARRILLI, R., RICCI, V., ROMANO, M. Molecular response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*-induced cell damage. **Cell Microbiol.**, 1, p.93-99, 1999.

ZULLO, A. Cancer stem cell hypothesis and gastric carcinogenesis: Experimental evidence and unsolved questions. **World J. Gastroenterol.**, 4(3), p. 54-59, 2012.

## ANEXO I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Hospital Universitário João de Barros Barreto, está desenvolvendo uma pesquisa que permitirá conhecer melhor os mecanismos que ocasionam as lesões do estômago e o desenvolvimento de tumor gástrico, através da identificação de infecções, e das alterações genéticas (cromossomos e genes) associadas ao quadro clínico do paciente, além do exame histopatológico. Estes estudos são realizados em pequenos fragmentos de tecido estomacal removido por cirurgia ou por exame endoscópico e oferecem novas possibilidades de diagnóstico.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital, para estabelecimento de diagnóstico e/ou tratamento de alguma doença gástrica e há a necessidade da remoção de material biológico relacionado à enfermidade. Parte do material retirado é encaminhado para exames laboratoriais, necessários para o diagnóstico definitivo. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário.

A obtenção do fragmento de tecido estomacal para pesquisa não implicará em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem em aumento no tempo do exame ou cirurgia. O fragmento de material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras, preservando sua privacidade e identidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do paciente.

É necessário esclarecê-lo (a) que não existem benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu atendimento ou tratamento.

Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação à pesquisa, por gentileza, entre em contato com o Prof. Rommel Burbano, pelo telefone 3201-8425 ou 88364667.

Uma cópia deste documento será arquivada em seu prontuário e, se desejar, uma cópia lhe será fornecida.

<p style="text-align: center;">Declaro estar ciente das informações prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o teor, e autorizo a utilização de amostras de tecido retiradas de meu organismo.</p> <p style="text-align: center;">Belém, ..... de ..... de .....</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">Assinatura do Paciente ou Responsável</p> <p>Nome: .....</p> <p>RG: .....</p>
--

## ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO  
COORDENADORIA DE ATIVIDADES ACADÊMICAS  
DIVISÃO DE PESQUISA E EXTENSÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 14.05.2004, o projeto de pesquisa intitulado "*Genética do Câncer Gástrico*", desenvolvido por Marília de Arruda Cardoso Smith, Rommel Burbano, Sílvia Regina Caminada de Toledo e Maisa Yoshimoto, sob a Orientação do Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção, obtendo **APROVAÇÃO** para desenvolvê-lo nesta instituição.

Belém, 14 de maio de 2004

  
DR. EDUARDO LEITÃO MAIA

CRM 1997

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa/ HJBB

## ANEXO III

## FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DAS AMOSTRAS TUMORAIS

